

**VASKULARISATION DES KNOCHENGEBES -
UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN
UND DEREN STANDARDISIERUNG**

REINER SEIBOLD

1985

*Diss.
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Chirurgischen Klinik Innenstadt und Chirurgischen
Poliklinik der Ludwig Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. L. Schweiberer

VASKULARISATION DES KNOCHENGEWEBES -
UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN UND DEREN STANDARDISIERUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Reiner Seibold
aus
Freising
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. F. Eitel
Mitberichterstatter: Prof. Dr. L. Schweiberer
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 25.2.1986

INHALTSVERZEICHNIS

1. <u>Einführung</u>	1
1.1. Die Bedeutung angiographischer Untersuchungs- techniken in der Osteologie	1
1.2. Definitionen	1
1.3. Prinzip der Mikroangiographie	2
1.4. Historische Entwicklung	2
1.5. Die verschiedenen technischen Möglichkeiten einer Gefäßdarstellung	3
1.6. Probleme der histologischen Weiterverarbeitung	4
1.7. Zielsetzung	5
2. <u>Methodik</u>	7
2.1. Versuchstiere, Narkose und operative Vorbereitung	7
2.1.1. Versuchstiere	7
2.1.2. Narkose und operative Vorbereitung	7
2.2. Injektion der Angiographiemedien	9
2.2.1. Vorspülen	9
2.2.2. Rußdispersion	9
2.2.3. Bariumsulfat	9
2.3. Exartikulation, Präparation und Fixieren	10
2.4. Einbettung unter Verwendung von Methylmethacrylat	11
2.4.1. Entwässerung mit aufsteigender Alkoholreihe	11
2.4.2. Methacrylateinbettung	11
2.4.3. Schnitttechnik	12
2.4.4. Entkalkung	12
2.4.5. Entwässerung der entkalkten Schnitte	13
2.4.6. Eindecken der Methacrylatschnitte	13
2.5. Einbettung unter Verwendung der Plastination	15
2.5.1. Plastination	15
2.5.2. Gefrier austausch	15
2.5.3. Platinieren von Knochen	16
2.5.4. Schnitttechnik	17

2.5.5. Entkalkung	17
2.5.6. Entwässerung	17
2.5.7. Nachplastination	17
2.5.8. Überfräsen und Weiterverarbeitung	19
2.6. Mikroangiogramme und Differenzverfahren	19
3. <u>Ergebnisse</u>	20
3.1. Entkalkung	20
3.2. Photodokumentation	25
3.2.1. Präparatzurichtung und stereomikroskopische Untersuchungstechnik	25
3.2.2. Stereomikroskopische Gefäßdarstellungen in der zweidimensionalen Photodokumentation	30
4. <u>Diskussion</u>	36
4.1. Mikroangiographie mit Ruß und Bariumsulfat	36
4.1.1. Übereinstimmung mit in vivo-Verhältnissen	36
4.1.2. Spezifität	37
4.1.3. Reproduzierbarkeit	37
4.2. Entwässerung	40
4.3. Plastination	40
4.4. Entkalkung	42
4.5. Durchsichtigmachen	43
5. <u>Zusammenfassung</u>	45
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	47
7. <u>Anhang</u>	51
8. <u>Danksagung</u>	62
9. <u>Lebenslauf</u>	63

VASKULARISATION DES KNOCHENGEWEBES - UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN UND DEREN STANDARDISIERUNG

1. Einführung

1.1. Die Bedeutung angiographischer Untersuchungstechniken in der Osteologie

Die Gewebsvaskularisation am Knochen ist ein wichtiger biologischer Parameter bei der Untersuchung der Pathophysiologie des Knochentraumas, bei Fragen der Frakturheilung und zur Prüfung von Therapieeffekten. Osteosynthesematerial ermöglicht einerseits eine rasche Wiederherstellung der durch ein Trauma zerstörten Gefäßbezirke, kann aber andererseits bei der Implantation im Sinne einer Nebenwirkung auch zur Devaskularisierung und damit zur Fragmentnekrose führen. Diese wechselseitigen Einflüsse können experimentell durch die Mikroangiographie verfolgt werden. Ihre Kenntnis aufgrund mikroangiographischer Studien trägt zur Abschätzung der klinischen Wertigkeit von Behandlungsmethoden bei.

1.2. Definitionen

Die Zahl der kontrastmittelgefüllten Gefäßanschnitte pro Flächen- bzw. Volumeneinheit sowie Verzweigungsmuster und Vernetzungsgrad im mikroangiographischen bzw. stereomikroskopischen Bild stellen das Gefäßverteilungsmuster (Vaskularität) des Gewebes dar. Da die Verzweigungsrichtung der Richtung des Stromflusses entspricht, kann somit auf die Vaskularisation als funktionelles Kriterium der Mikrozirkulation geschlossen werden. Zeitlich gestaffelte Untersuchungen der Zahl neugebildeter Gefäßsprossen pro Volumeneinheit und der Verzweigungsrichtung ergeben das Verteilungsmuster des kapillären Sprossungsprozesses, der morphologisch als Revaskularität bezeichnet werden könnte. Die Revaskularisation als funktionelles Kriterium des Stromflusses im vorgeschädigten Gewebe

läßt sich daraus ableiten (3). Diese Variablen können mit der Technik der Mikroangiographie dargestellt und untersucht werden.

1.3. Prinzip der Mikroangiographie

Prinzip der Mikroangiographie ist die irreversible Auffüllung des Gefäßbaumes mit einem Medium, das aufgrund seiner Stoffeigenschaft die Gefäße vom umgebenden Gewebe unterscheidbar macht und auch auf mikroskopischer Ebene ihre Identifikation ermöglicht. Bei Infusion von kontrastgebenden Substanzen kann anschließend das Gefäßverteilungsmuster röntgenologisch makroskopisch dargestellt werden. Es ist auch möglich, von einzelnen Gewebeschnitten das sogenannte Mikroangiogramm durch eine Röntgenaufnahme herzustellen, das seinerseits mikroskopisch oder durch photographische Vergrößerung ausgewertet wird. Diese röntgendichten Medien sind aber auch im histologischen Bild sichtbar, im Durchlicht wegen ihrer Lichtundurchlässigkeit und im Auflicht durch ihre Eigenfarbe oder aber beigemischte Farbstoffe. Sie ermöglichen es auch, nach Durchsichtigmachen des Gewebes durch Einbettung in Substanzen mit einem Brechungsindex, der demjenigen des Gewebes gleicht, dem Prinzip von Spalteholz (20), das dreidimensionale Gefäßnetz im Stereomikroskop zu betrachten.

1.4. Historische Entwicklung

Schon 1904 nahm Lexer (13,14) Angiographien vor durch intraarterielle Injektion von Quecksilberterpentinöl. Trueta (22) beschrieb 1947 als Erster die Verwendung einer Bariumsulfat-Suspension mit 10% Silberjodid, 2% Berliner Blau und Neoprene Latex versetzt. 1962 beschränkten sich Rhineland und Baragry (18) auf die Infusion einer 30%igen reinen Bariumsulfat (Mikropaque)-Lösung. Das von ihnen eingeführte Verfahren fand weite Verbreitung und wurde in Arbeiten von Van De Berg, Dambe und Schweiberer (1,2) weiter ausbearbeitet. Die Injektion von farbigen (23) und eventuell röntgendichten (7) Kunststoffen findet neuerdings zunehmend

Anwendung. So beschreibt Reinhold (17) die Kombination zweier flüssiger Latexverbindungen und eines Farbstoffes, wobei eine niedrigvisköse Infusionslösung entsteht, die anschließend durch ein spezielles Entwicklerbad ausgehärtet wird. Auch farbige Methacrylate werden häufig verwendet (23). Eine Angiographiemethode zur Differenzierung von Arterien und Venen beschreibt Eitel 1981 (3), indem er Tuscheangiographie und Bariumsulfat-Injektion kombiniert und damit das Venensystem schwarz und die Arterien weiß zur Darstellung bringt. Eine weiterführende Möglichkeit ist die Kombination von anterograd bzw. retrograd injiziertem gefärbtem Epoxidharz, gefolgt von einer Bariumsulfat-Injektion (Eitel, Hohn, Kaderly: persönliche Mitteilung).

Eine wesentliche Entwicklung im Zusammenhang mit der Mikroangiographie war die von Spalteholz (20) entdeckte Methode, Gewebe durchsichtig und damit die bei der Mikroangiographie angefärbten Gefäße sichtbar und dreidimensional im Stereomikroskop darstellbar zu machen. Die Problematik der Handhabung dieser Methode führte in der vorliegenden Arbeit zu dem Versuch, sie durch spezielle Aufarbeitung von in Methylmethacrylat eingebetteten Knochen zu ersetzen. Aufgrund technischer Nachteile auch dieser Methode wurde schließlich mittels Knochenplastination ein neues Verfahren entwickelt.

1.5. Die verschiedenen technischen Möglichkeiten einer Gefäßdarstellung

Die Verwendung von Quecksilberterpentinöl, Silberjodid u. a. hat heute nur noch historische Bedeutung. Bereits Spalteholz beschreibt die Tuscheangiographie. Neben der bewährten Bariumsulfat-Suspension finden zunehmend Kunststoffe Verwendung. Reinhold beschreibt die Kombination zweier Latexverbindungen, die eine dient zum Binden des Farbstoffes (Luconyl Blau, diffundiert durch die Gefäßwand ins Gewebe, wenn es allein verwendet wird), die andere zum Erstarren der Angiographielösung.. Wray und Lynch verwenden Methacrylate. Sie dienen als Technovit^R vor allem der Herstellung anatomischer Lehrpräparate zur makroskopischen Demonstration von

Gefäßbäumen. Ein allen Methoden gemeinsames Problem ist getrennte Darstellung von Arterien und Venen. Man kann blaues und rotes Technovit^R getrennt von venöser und arterieller Seite injizieren oder nacheinanderfolgend Tusche und Bariumsulfat (3). Die Tusche füllt dabei zunächst das gesamte Gefäßsystem, anschließend verdrängt das Mikropaque die Tusche aus den Arterien, um hierbei bis zu den Arteriolen vorzudringen. Da es nicht kapillargängig ist, wird das Kapillarbett sowie das Venensystem durch Tusche schwarz gefärbt, während der arterielle Schenkel von der Bariumsulfat-Suspension weiß markiert wird.

Die Aufarbeitung angiographierten Gewebes beinhaltet, auf die Gefäßdarstellung bezogen, zwei Aspekte: Die Anfertigung einer Röntgenaufnahme von einem 1mm dicken Gewebeschnitt ergibt das eigentliche Mikroangiogramm, das seinerseits, wie oben erwähnt, mikroskopisch oder photographisch vergrößert wird. Je nach Autor werden für diesen Zweck unterschiedliche Röntengeräte angegeben (1,2, 3,18,19). Wird nun ein ähnlich dicker Schnitt transparent gemacht nach Spalteholz, so entsteht ein für die Betrachtung im Stereomikroskop geeignetes Objekt.

1.6. Probleme der histologischen Weiterverarbeitung des angiographierten Gewebes und im Besonderen des angiographierten Knochen

Der Knochen schafft als Hartgewebe besondere Probleme für die histologische Aufarbeitung. Die Röntgenaufnahme des unentkalkten Knochenschnittes ergibt das sogenannte Mikroradiogramm, ein Untersuchungsverfahren, das Aussagen über den Kalkgehalt des Knochens ermöglicht. Ebenfalls aus unentkalktem Knochen werden Präparate hergestellt, die die Auswertung des Knochenanbaus mittels Fluoreszenzmarkierung gestatten. Die Mikroangiographie jedoch sowie verschiedene histologische Techniken und das Durchsichtigmachen des Knochens nach Spalteholz erfordern das Entkalken des Knochens. Dies geschieht meist in 5%iger Salpetersäure, wobei etwa sechs Wochen für einen mittelgroßen Röhrenknochen benötigt werden. Dabei geht nicht nur viel Zeit verloren, auch das den Knochen direkt

umgebende Weichteilgewebe wird bei dieser Prozedur verändert. Die anschließende Bleichung und Entwässerung, wie von Spalteholz angegeben, ist Voraussetzung für die Überführung des Präparats in die optisch aufhellende Lösung. Geeignet als solche ist nach Spalteholz Methylsalizylat (Wintergrünöl) mit einem Brechungsindex von 1,5361 (20°C), der durch Zumischen noch anderer ähnlicher Substanzen dem des Gewebes (1,547 nach (20)) angepaßt werden kann. Die Präparate verbleiben auf Dauer schwimmend im Wintergrünöl, auch zur Mikroskopie. Methylsalizylat ist jedoch stark riechend und gesundheitsschädlich. Die Handhabung der schwimmenden Präparate unter dem Mikroskop ist umständlich. Ein auf diese Weise entkalkter und durchsichtiggemachter Knochen (z.B. ganze Tibia) kann für die oben erwähnten Untersuchungstechniken, die unentkalkten Knochen erfordern, nicht verwendet werden, so zum Beispiel gehen durch Entkalkung die Fluoreszenzfarbstoffe verloren. Damit ist die Aussagekraft der angiographierten Knochen erheblich eingeschränkt, denn verschiedene gleich wichtige Untersuchungstechniken schließen sich hier aus, zumindest, wenn man bei einem relativ kleinen Bezirk möglichst dicht aufeinanderfolgend alle oben erwähnten Verfahren zugleich anwenden möchte. Aus den nicht eingebetteten Spalteholzpräparaten gezielte Proben zu entnehmen und daraus 50µm dicke Dauerpräparate auf Objektträgern zur histologischen Untersuchung speziell interessierender Areale bzw. Gefäße herzustellen, ist allenfalls auf technischen Umwegen möglich. Die Schnittdicke (nach Spalteholz 1-2mm mit dem Skalpell) und Schnittabfolge ist nicht standardisierbar, und somit ist eine quantitative Morphologie nicht möglich.

1.7. Zielsetzung

Ein Ziel der Arbeit ist, durch Modifizierung der Entkalkungs- bzw. Einbettungsmethoden das Problem der Inkompatibilität von angiographischen und histologischen Untersuchungsmethoden, das durch die Entkalkung entsteht, zumindest einer Teillösung zuzuführen, und die in ihrer Handhabung sehr umständliche Spalteholzmethode,

die mit der Durchsichtigmachung des Gewebes ein für die Morphologie sehr wichtiges Verfahren darstellt, zu verbessern oder zu ersetzen.

Ein weiteres Ziel ist es, die Tusche/Bariumangiographie technisch auszuarbeiten.

Insgesamt soll die Methode von der Angiographie bis zum fertigen Präparat für das Stereomikroskop standardisierbar sein und damit die Grundlage schaffen für die Herstellung standardisierter Gewebeschnitte in Form von transparenten Dauerpräparaten mit konstanten optischen und mechanischen Eigenschaften. Dadurch wird die quantitative Auswertung des stereomikroskopischen Bildes, d.h. die quantitative Morphologie des Gefäßverteilungsmusters durch Auszählen von Gefäßquerschnitten u.ä. pro definierter Gewebeeinheit ermöglicht.

2. Methodik

2.1. Versuchstiere, Narkose und operative Vorbereitung

2.1.1. Versuchstiere

Die im folgenden beschriebenen Angiographie- und Präparationstechniken wurden zunächst an 200-250g schweren weiblichen Wistar-Ratten, dann an 3-4 jährigen männlichen Schäferhunden und schließlich an 4jährigen weiblichen Texelschafen erarbeitet.

2.1.2. Narkose und operative Vorbereitung

Zur Prämedikation verwendet man Vetranquil^R bei Hunden bzw. Rompun^R bei Schafen, beides intramuskulär verabreicht. Die eigentliche Narkose wird mit Nembutal^R oder Narkoren^R (Pentobarbital) durchgeführt. Für Ratten bewährt sich die intraperitoneale Verabreichung von Chloralhydrat während einer Ätherkurznarkose. Der Exitus der narkotisierten Tiere erfolgt während der Infusion der Bariumsulfatlösung unter dem Bild der pulmonalen Hypertonie durch Mikroembolisation der Lungenstrombahn.

Die operative Vorbereitung der Angiographie von größeren Tieren besteht in der Freilegung der distalen Aorta bzw. Arteria und Vena femoralis oder axillaris, je nach der interessierenden Extremität. Der Zugang zu den erwähnten Gefäßen über eine Unterbauchlaparotomie, die Leiste bzw. Axilla ist schnell und problemlos vorzunehmen. Ein Freilegen der Aorta zur Angiographie der unteren bzw. des linken Ventrikels für die obere Extremität ist die Methode der Wahl bei kleinen Versuchstieren wie z.B. der Ratte. Nach sorgfältigem Denudieren der Arterie mit der Präparierschere über eine Strecke von ca. 3cm wird um das proximale und das distale Ende des freigelegten Abschnitts je ein Faden gelegt. Nach Unterbindung des Gefäßes mit dem proximalen Faden wird in der Mitte des denudierten Bereichs mit dem Skalpell oder einer Pott'schen Schere eine T-förmige Inzision

vorgenommen, bis das Gefäßlumen klafft. In diese Öffnung wird der Infusionskatheter eingeschoben und mit dem distalen Faden fest eingebunden. Die lang belassenen Enden des proximalen Fadens dienen zur zusätzlichen Befestigung des Katheters, um ein Zurückrutschen zu verhindern. Beim Einführen des Katheters muß dieser gefüllt sein und mit dem ebenfalls gefüllten Infusionssystem, das die Angiographiesubstanzen enthält, verbunden sein. Luft in der Spitze des Katheters bzw. im System führt zu Füllungsdefekten. Am besten läßt man die Infusion beim Einführen ganz leicht tropfen. Als Katheter haben sich hauptsächlich Luer-Ernährungs sonden in verschiedenen Dicken, je nach Gefäßkaliber, bei den peripheren Extremitätenarterien bewährt. Die vorne geschlossene und runde Spitze dieser Sonden (mit seitlichen Löchern) soll abgeschnitten werden, um einen guten Fluß zu gewährleisten. Für die Kanülierung der Arteria axillaris bei Hunden ist eine 1,5mm Ernährungs sonde zu verwenden (die Gefäßquerschnitte sind meist überraschend klein, zumal es durch die Präparation zur Gefäßkontraktion kommt). Die Arteria femoralis beim Hund kann auch direkt mit dem abgeschnittenen Schlauch des Infusionssystems kanüliert werden (je größer das Lumen, desto besser der Fluß). Bei der Ratte sind zur Kanülierung der Aorta 0,70mm Braunülen zu empfehlen, die über die Inzision ohne Mandrin eingeschoben werden. Diese Braunülen bzw. Ernährungs sonden werden über einen Dreiweghahn mit den verschiedenen Infusionssystemen für die einzelnen Angiographiesubstanzen verbunden. Laufen die Angiographielösungen zu langsam ein, ohne daß ein Verklemmen der Sondenspitze z.B. in der Ellenbeuge bei zu weitem Vorschieben oder ähnliche Umstände als Ursache gefunden werden, kann durch eine Inzision der begleitenden Vene eine Entlastung geschaffen werden, die zudem eine bessere Beurteilung des Refluxes von Angiographielösungen ermöglicht. Das Kanülieren der Vene, wie häufig beschrieben (3), ist nicht nötig.

2.2. Injektion der Angiographiemedien

2.2.1. Vorspülen

Unmittelbar nach dem Festbinden des Katheters wird die Spül-
lösung in Gang gesetzt. Pro Extremität dient dazu je eine
500ml Plastikinfusionsflasche mit Ringerlösung, der 5000 Ein-
heiten Heparin zugegeben werden. Blutgerinnsel in den Gefäßen
führen zu Füllungsdefekten. Bereits nach wenigen Minuten fließt
aus der Vene klare Flüssigkeit zurück. Dann kann mit der Kon-
trastmittelinfusion begonnen werden.

2.2.2. Rußdispersion

Nach dem Einlaufen der Ringerlösung wird der Dreiwegehahn auf
das mit Rußdispersion gefüllte Infusionssystem umgeschaltet.
Verwendet wird eine Rußdispersion (AN 1 16/1 der Firma Degussa),
die mit Ringerlösung zu einer 10%igen Rußlösung zu verdünnen
ist. Der Einfachheit halber zieht man mit einer 50ml-Spritze
aus einer 500ml Plastikflasche mit Ringerlösung 50ml ab und gibt
die gleiche Menge Rußdispersion zu (pro Extremität reicht 1 Fla-
sche). Diese Infusionsflasche wird 180cm über dem Versuchstier
aufgehängt, wobei bei Verwendung von 1,5mm-Ernährungs-
sonden ein Druck von 120mm Hg entsteht.

Bei der Ratte kann man auch kleinere Mengen 10%iger Ruß-Ringer-
lösung in einem Becherglas herstellen und mit einer 50ml-Spritze
von Hand injizieren (50ml über die Aorta verabreicht reichen
für die Angiographie der unteren Extremität aus, ein Anhängen
von Infusionsflaschen erübrigt sich aus praktischen Gründen).

2.2.3. Bariumsulfat

Auf ähnliche Weise wie zuvor beschrieben, wird die Bariumsulfat-
lösung hergestellt: Aus einer 500ml Ringer-Plastikinfusions-
flasche werden 150ml abgelassen und dieselbe Menge Mikropaque-

suspension zugegeben. Diese 30%ige Lösung wird anschließend an die Rußdispersion infundiert. Damit sich die Medien möglichst wenig mischen, wird ein neues Infusionssystem verwendet. Die Bariumsulfat-Lösung tropft wesentlich langsamer, aber es können im allgemeinen 500ml Lösung pro Extremität infundiert werden. Das Infusionssystem muß filterlos sein, um ein Verstopfen der Siebe zu vermeiden. Es ist ausschließlich suspensionsstabilisiertes Mikropaque zu verwenden, da Mikropaque-Pulver in 30%iger Lösung in wenigen Minuten zum Absinken des Lösungsüberschusses und damit zum Verstopfen des Systems führt, trotz definierter Teilchengröße von $0,5\mu\text{m}$. Wandadhäsionen und Embolisierungseffekte führen zum präkapillaren Stopp des Bariumsulfats (3,11,18,19). Bereits kurze Zeit nach Beginn der Infusion kommt es zu einem erheblich langsameren Tropfen der Mikropaquelösung. Zu diesem Zeitpunkt tritt ein graugefärbter Reflux in den Venen auf, offenbar kommt es durch in der Ischämie geöffnete arteriovenöse Anastomosen zum Einstrom von Bariumsulfat in die venöse Blutbahn. Danach wird eine pulmonale Hypertonie beobachtet mit Rückstau des Kontrastmittels in das Infusionssystem, worauf es dann meist zum Exitus des narkotisierten Tieres kommt. Ein langsames Tropfen kann dann noch über Stunden hinweg beobachtet werden bei konstantem Infusionsdruck von 120mm Hg (180cm Höhendifferenz Tisch-Infusionsflasche). Wie bei der Rußdispersion wird auch die Mikropaquelösung bei der Ratte mit einer Plastikspritze von Hand injiziert (60-100ml).

2.3. Exartikulation, Präparation und Fixieren der Extremität

Je nach interessierendem Knochen wird im nach proximal nächstgelegenen Gelenk die Exartikulation vorgenommen. Größere Gefäße in der Leiste, Kniekehle, Axilla oder Ellenbeuge werden am besten unterbunden. Bei größerem Weichteilmantel kann ein Ausfließen des Kontrastmittels durch Schneiden mit dem elektrischen Messer vermindert werden. Die enthäuteten Extremitätenteile samt Muskulatur werden für 24 Stunden in 50%iges Äthanol gelegt. Danach prä-

pariert man die Weichteile unter Schonung des Periosts ab und legt die Knochen in frisches 50%iges Äthanol. Das Fixieren von ganzen Hundeknochen benötigt insgesamt etwa zwei Wochen, bis mit der Entwässerung begonnen werden kann. Ist der Knochen zur Plastination vorgesehen, kann auch das frische Gewebe direkt dem Gefrier austausch zugeführt werden. Zur Identifizierung erfolgt die Markierung der Knochen am besten mit Bleistift auf Halbkartonstreifen.

2.4. Einbettung unter Verwendung von Methylmethacrylat

2.4.1. Entwässerung mit aufsteigender Alkoholreihe

Nach dem Fixieren werden die zu untersuchenden Knochen bzw. die mit der Knochensäge (Bandsäge) hergestellten Teilstücke entwässert. Ausgehend von 50%igem Äthanol werden die einzelnen Präparatstücke samt Markierung über 70%igen, 80%igen, 90%igen, 96%igen bis zum absoluten Alkohol geführt. Je nach Präparatgröße benötigt dabei jeder Schritt mehrere Tage (dies gilt z.B. für 10cm lange Röhrenknochenstücke des Hundes, hingegen kann bei Rattenextremitäten dieselbe Prozedur in insgesamt 4 Tagen durchgeführt werden).

2.4.2. Methacrylateinbettung

Die Einbettung der alkoholentwässerten Präparate in Methylmethacrylat erfolgt üblicherweise nach Zwischenschaltung eines Intermediums, z.B. Methanol oder Xylol, wobei das nach dem absoluten Alkohol folgende Methanol dreimal für je einen Tag angesetzt wird. Aber auch durch Gefrier austausch mit Aceton entwässerte Präparate können über Xylol der Acrylateinbettung zugeführt werden.

Zur Technik der Einbettung selbst siehe Anhang.

Zum Ausgießen der Knochen sind Glasgefäße geeignet, die nach dem Erhärten zerschlagen werden, oder acetonfeste elastische

Plastikgefäße (z.B. Tupperware^R), die wiederverwendet werden können.

2.4.3. Schnitttechnik

Methacrylatblöcke werden mit einer Hand-, Kreis- oder Bandsäge auf ein Format gebracht, das das Einspannen des Blocks in das Sägemikrotom (Firma Leitz) zuläßt.

Das Sägemikrotom ermöglicht Schnittdicken von 50µm aufwärts bei einem Verbrauch von Präparatmasse von 300µm Dicke pro Schnitt. 10µm oder weniger dicke Präparate können nur mit einem Schlittenmikrotom mit Hartmetallmesser hergestellt werden. Die so entstandenen Kunststoffschnitte werden im weiteren Verlauf entweder direkt zur Mikroradiographie verwendet oder mit Eukitt auf Objektträger aufgeklebt zur Fluoreszenzmikroskopie (bei fluorochromierten Präparaten). Weiterhin möglich sind Oberflächenfärbung oder, nach Auslösen des Acrylats, die üblichen histologischen Färbetechniken. Für die Mikroangiographie bzw. Stereomikroskopie ist Voraussetzung, daß man die Präparate entkalkt. Die einzelnen Schnitte werden markiert, indem der entsprechende Code mit Bleistift direkt auf das Methacrylat geschrieben wird.

2.4.4. Entkalkung von Methacrylatschnitten

Wie in der Einführung erwähnt, ist die Entkalkung von großen Röhrenknochen zeitaufwendig und macht viele andere Untersuchungstechniken am gleichen Knochen unmöglich. Nicht so bei Schnittentkalkung. Es ist jedoch schwierig, von uneingebettetem frischem Knochen Schnitte von 100-500µm herzustellen, da die Knochenschlifftechnik zeitraubend ist und viel Knochenmaterial verbraucht. Einfacher ist es, den eingebetteten Knochen wie oben beschrieben mit der Innenlochsäge (Sägemikrotom Leitz) zu zerschneiden und die einzelnen Schnitte zu entkalken.

Für einen 1mm dicken Knochenschnitt kann man bei Verwendung von

10%iger Salpetersäure nach drei Stunden mit vollständiger Entkalkung rechnen (röntgenologische Kontrolle der Entkalkung siehe 2.6.).

2.4.5. Entwässerung der entkalkten Schnitte

Sie werden nach dem Entkalken eine Stunde lang gewässert und dann in 50%iges Äthanol gelegt. Über 70%iges, 80%iges, 96%iges und 100%iges Äthanol für je eine Stunde werden sie entwässert. Zu beachten ist, daß Austrocknung der Präparate zu einer milchglasartigen Trübung und zu starker Schrumpfung der Präparate führt, die sie unbrauchbar macht.

2.4.6. Eindecken der Methacrylatschnitte

Die entwässerten Präparate werden aus dem absoluten Alkohol in ein Medium gebracht, dessen Brechungsindex dem des Gewebes entspricht. Gleichzeitig soll dieses Medium als Eindeckmittel für Objektträger geeignet sein. Bei gleichem Brechungsindex wird das Präparat durchsichtig (20). Dieser ist aber nicht konstant, da er sich bei verschiedenen Gewebearten und unterschiedlichen Gewebesichtdicken ändert. Hier arbeitet man also näherungsweise und empirisch.

Tabelle 1

Brechungsindices verschiedener Substanzen und deren Eigenschaften

Substanz	n_D (20°C)	Eigenschaften
Knochen	1,547 (18)	
Eukitt	1,4917	ergibt trübe Präparate (ähnlich Diatex)
Methylbenzoat	1,5158	gut zum Aufhellen geeignet, aber ohne Klebewirkung, zum Eindecken ungeeignet
Methylsalizylat	1,5361	gut zum Aufhellen geeignet, aber ohne Klebewirkung, zum Eindecken ungeeignet
L_{15}^*	1,5145	zähflüssig, gut aufhellendes Medium, zum Eindecken von 100µm-Schnitten gut geeignet
L_{25}^*	1,5248	zähflüssig, gut aufhellendes Medium, zum Eindecken von 100µm-Schnitten gut geeignet
Kanadabalsam	1,535	hochviskös, günstig bei dickeren Präparaten (bis 500µm)

* Eindeckmittel für Phasenkontrastmikroskopie der Firma Zeiß

Die Klebekraft ist deshalb wichtig, weil auch die entkalkten Präparate bei der Entwässerung leicht wellen, so daß sie das Deckglas immer wieder vom Objektträger abheben, wenn die Klebewirkung nicht ausreicht.

Präparate mit 500µm werden am besten erst in Xylol gelegt (hierdurch wird das Acrylat geschmeidig) und nach ca. 3 Stunden mit Kanadabalsam eingedeckt, der jedoch sehr langsam trocknet. Schnittdicken von 1000µm sind mit dieser Technik kaum saubere einzudecken und für die Stereomikroskopie zu trübe. 100µm-Schnitte sind leicht und schnell mit L_{15} einzudecken.

2.5. Einbettung unter Verwendung der Plastination

2.5.1. Plastination

Das Prinzip der Plastination (8) besteht darin, daß zunächst durch Gefrier austausch das Gewebswasser durch Aceton ersetzt wird. Das von Aceton durchdrungene Präparat wird in flüssiges Harz gelegt. Im Exsikkator kommt dann durch Druckverminderung das Aceton (Intermedium) zum Kochen, nicht jedoch das Harz, welches einen wesentlich höheren Siedepunkt besitzt. Unter Ausnutzung dieser Siedepunktsdifferenz kann also das Aceton im Präparat abgesaugt werden, worauf unter diesem Sog das Harz ins Präparat eindringt. Man ersetzt also über die Zwischenstufe Aceton letztlich Gewebswasser durch Kunstharz. Diesem ist ein Härter beigemischt, der zur Polymerisation des Harzes führt und somit eine feste Blockeinbettung ermöglicht. Methylenchlorid ist aufgrund seines niedrigen Siedepunktes ebenfalls als Intermedium geeignet und bietet den wesentlichen Vorteil, daß auch ein Teil des Gewebefetts ausgelöst wird. Äthanol ist zur Plastination nicht geeignet, die Siedepunktsdifferenz zum Harz ist zu gering. Der Vorgang, bei dem Aceton durch Harz ersetzt wird unter Dauersog im Exsikkator, wird als forcierte Imprägnierung bezeichnet (8).

2.5.2. Entwässerung durch Gefrier austausch

Das Prinzip des Gefrier austausches ist ein wichtiger Teilaspekt der Plastination (8). Die Knochen werden nach der Weichteilpräparation und Fixierung in -25°C kaltes Aceton gelegt. Für drei Wochen bleiben sie in dieser Lösung liegen, danach wird das Aceton gewechselt und verbleibt für eine weitere Woche in der Gefriertruhe. Ein drittes Acetonbad wird für einige Tage angeschlossen. Insgesamt benötigt der Gefrier austausch bei größeren Präparaten wie Hundeknochen vier Wochen. Kleine Stücke, z.B. Rattenextremitäten, sind in weniger als einer Woche zu entwässern.

Das dritte Acetonbad kann bei den nächsten Präparaten als erstes Bad noch einmal verwendet werden. Den Restwassergehalt kann man mit dem Alkoholometer bestimmen (8). Er sollte, je nach Plastinationstechnik, unter 1% liegen (8). Nach dem letzten Acetonbad können die Knochen in Methylenchlorid gelegt werden (Zimmertemperatur), als letztem Intermedium vor der Einbettung. Dadurch wird Gewebefett herausgelöst, so daß sich später eine höhere Transparenz der Präparate erreichen läßt.

2.5.3. Plastinieren von Knochen

Zur Plastination von Knochen verwenden wir das Epoxidharz Biodur E₁₂, das mit dem Aminhärter Biodur E₁ bzw. dem Anhydridhärter Biodur E₆ gemischt wird. Der Aminhärter ist relativ wenig restwasserempfindlich (2-3%), aber nur für Präparate bis zu 1cm Dicke geeignet. Der Anhydridhärter stellt höhere Ansprüche an die Entwässerung (unter 1% Restwasser), ist aber auch für große Röhrenknochenstücke verwendbar. Das Gemisch E₁₂/E₆ kann auch nach Polymerisation mit 10%igem Natriummethylat aus dem Schnitt herausgelöst werden (Deplastination, beim Aminhärter nicht möglich)(6). Zum Harzansatz kann der Weichmacher Biodur E₁₀₁₀ gegeben werden. Je nach Anteil von Härter und Weichmacher sind Verarbeitungszeit, Polymerisationsgeschwindigkeit und Endhärte bzw. thermoplastische Eigenschaften variierbar. (Mischungsverhältnisse etc. siehe Tabellen unter 7. Anhang) Der Ablauf des Plastinierens gestaltet sich somit folgendermaßen: acetonentwässerte Präparate werden in ein Harzgemisch gelegt und verbleiben für 12-72 h (je nach Gemisch, siehe Anhang) im Exsikkator unter Dauersog, bis alles Aceton abgesaugt ist (es steigen keine Blasen mehr auf). Danach erfolgt die Aushärtung im Brutschrank bei 50°C. Zum Ausgießen müssen acetonteständige Kunststoffgefäße benützt werden (z.B. Tupperware^R) oder Glasgefäße, die mit acetontester Folie (Polypropylen, Polyester) ausgekleidet sind. Der Aminhärter E₁ kann auch vom Glas direkt abgeformt werden, wenn das Trennmittel Biodur D₁₀₀₀

aufgetragen wird.

2.5.4. Schnitttechnik

Das Herstellen der einzelnen Schnitte mit dem Sägemikrotom erfolgt nach der gleichen Technik wie bei Acrylatblöcken.

Für Schnittdicken von 100µm und weniger darf dem Harz/Härtungsmisch nicht zu viel Weichmacher beigemischt werden, da sonst beim Schneiden des harten Knochens der Kunststoff zerreißt (siehe Anhang).

2.5.5. Entkalkung von Epoxidschnitten

Epoxidschnitte lassen sich nach dem gleichen Verfahren entkalken wie Acrylatschnitte, jedoch muß mit um ein Drittel längeren Entkalkungszeiten gerechnet werden.

2.5.6. Entwässerung der Säure-entkalkten Epoxidschnitte

Die Entwässerung erfolgt hier wieder in Aceton bei -25°C. Es genügen zwei Lösungen, die erste über Nacht, die zweite für zwei bis drei Stunden.

Das Aceton löst den Weichmacher E₁₀₁₀ aus dem Harz heraus, so daß die Schnitte u.U. spröde werden. Dies kann verhindert werden (v.Hagens persönliche Mitteilung) durch Entwässerung mit einem Gemisch aus 80 Teilen Aceton und 20 Teilen Biodur E₁₀₁₀. Die einfachste Methode, das Trocknen zwischen Filterpapier, ist beim Epoxidschnitt ebenfalls möglich, führt aber zu starker Schrumpfung der entkalkten Bereiche.

2.5.7. Nachplastination

Die entkalkten und entwässerten Präparate werden in einen schnell polymerisierenden Harzansatz gelegt (Biodur E₁₂ hat einen

Brechungsindex von $n_D=1,550$) und für mindestens eine Stunde im Exsikkator bei einem Unterdruck von 5mmHg nachimprägniert. Dabei entweicht das Aceton des Entwässerungsganges. Nach diesem Schritt legt man die Präparate alle nebeneinander auf eine Kunststoffplatte mit erhöhtem Randwall, übergießt sie mit Harzgemisch und deckt das Ganze mit einer zweiten Kunststoffplatte ab und beschwert diese mit Bleiklötzchen (acetonfeste Kunststoffplatten bzw. mit Biodur D_{1000} beschichtete Glasplatten bei Verwendung des Aminhärters, wobei als Randwall 1mm dicke Epoxidstäbchen mit dem Sägemikrotom aus Harzresten hergestellt werden müssen). Dünne Silikonschnüre sind als Randwall am besten geeignet. Auch zwischen zwei Hostaphanfolien kann diese Nachplastination durchgeführt werden.

Je nach Harzansatz wird nach zwei Tagen abgeformt, und wir erhalten mit unserer Anordnung Platten aus Epoxid mit ca. 30x30cm, 1mm dick, die bis zu 20 Schnitte enthalten (z.B. 20 Schnitte von Rattenextremitäten, längs, 500 μ m dick). Das Abformen großer und dünner Platten kann dadurch erleichtert werden, daß man die thermoplastischen Eigenschaften des Epoxids nützt und, nachdem die obere der beiden Ausgießplatten abgenommen wurde, die untere samt der ihr anhaftenden Epoxidschicht unter fließendes warmes Wasser hält. Der Thermoplast wird folienartig weich und kann vorsichtig abgezogen werden. Im warmen Zustand wird das ganze Blatt wieder glatt ausgestrichen und mit kaltem Wasser übergossen, so daß wieder eine steife harte Platte entsteht. Die einzelnen Präparate können ebenfalls im erwärmten Zustand mit der Schere ausgeschnitten und in den üblichen Mappen aufbewahrt werden. Zu beachten ist, daß Kunststoffplatten mit mattierter Oberfläche dem Präparat ein trübes Aussehen geben. Das Überfräsen mit einer Ultrafräse schafft dann eine glatte durchsichtige Oberflächenstruktur.

2.5.8. Überfräsen der nachplastinierten Schnitte und Möglichkeiten histologischer Weiterverarbeitung

Die Präparate, die nach den Ausführungen unter 2.5.7. entstanden sind, enthalten z.B. 500µm dicke Schnitte in einem Epoxidplättchen, das selbst etwa 1000µm dick ist. Mit der Ultrafräse der Firma Jung (Diamantfräskopf) können diese Plättchen beidseits abgefräst werden, so daß planparallele Stücke entstehen, bei denen das Gewebe nur von Kunststoff eingerahmt bzw. durchdrungen ist, sich aber über dem eigentlichen Präparat kein Kunststoff mehr befindet. Diese Präparate, die kein Glas enthalten (Deckglas, Objektträger), erlauben es jetzt, Teilstücke wiederum auszusägen und mit dem Sägemikrotom davon Dünnschnitte für die Histologie herzustellen. Färbungen sind jedoch nur in Form von Kunststofffärbung (6), Oberflächenfärbung oder aber nach Deplastination, d.h. nach Auslösen des Epoxids mit Natriummethylat, möglich. Die Deplastination setzt die Verwendung von Anhydridhärtern voraus.

2.6. Mikroangiogramme und Differenzverfahren

Die Herstellung der Mikroangiogramme (auch zur Kontrolle der Vollständigkeit der Entkalkung siehe 3.) erfolgt mit einem Mammographiegerät vom Typ Senograph (Firma Koch und Sterzel KG, Essen).

Die Präparate werden auf Agfa Strukturix D4 Filme 6x24cm gelegt und bei einem Film-Fokusabstand von 31cm und einem Film-Objekt-
abstand von 0cm mit 22 kV bei 20 mA und 44 sec Belichtungszeit geröntgt. Zur Darstellung kommen die mit Barium gefüllten Arterien. Die Venen sind nur im Stereomikroskop an ihrer Rußmarkierung zu erkennen. Dann wird das Differenzverfahren angewandt, bei dem das Mikroangiogramm im Dia mit dem fotografierten Spalteholzbild (Dia) zur Deckung gebracht und erneut fotografiert wird, so daß arterieller und venöser bzw. kapillärer Schenkel des Gefäßsystems identifiziert werden können.

3. Ergebnisse

3.1. Entkalkung

Die Abhängigkeit der Zeitdauer der Entkalkung von der Säurekonzentration bzw. der Präparatdicke wurde untersucht, indem verschiedenen dicke Präparate bei gleicher Säurekonzentration bzw. gleich dicke Präparate bei verschiedenen Säurekonzentrationen in festen Zeitabständen geröntgt wurden (Technik siehe 2.6.). Der Zeitpunkt, an dem keinerlei Kalkschatten auf dem Röntgenbild mehr erkennbar war, wurde in Abhängigkeit von der Säurekonzentration bzw. der Präparatdicke graphisch aufgetragen (siehe Tabelle 2 und 3 und Abbildung 1 und 2). Bei 1mm dicken Schnitten muß demnach ein Zeitraum von 3 Stunden zur Entkalkung angenommen werden.

Desweiteren wurde untersucht, ob ein Knochenscheibchen von 2mm Dicke, das rundherum in Kunststoff eingeschlossen ist, ebenfalls entkalkt werden kann. Es hat sich gezeigt, daß auch nach mehreren Wochen der Kalkschatten unverändert war, obwohl ein gleich dicker Schnitt aus einem großen Block in 5 Stunden entkalkt ist.

Den Grad der Entkalkung an der Konsistenz/Weichheit der Kortikalis z.B. durch Nadelstiche zu überprüfen, ist beim Nativknochen möglich, nicht jedoch beim eingebetteten.

Die Entkalkung wurde auch mit Ameisensäure und EDTA versucht, wobei sich zeigte, daß EDTA das Barium aus den angiographierten Gefäßen herauslöst. Ameisensäure ist zwar geeignet für die Entkalkung, ist aber aus Kostengründen hintanzustellen.

Tabelle 2

Einwirkung verschiedener Säurekonzentrationen auf gleich dicke (3mm) Methacrylat- bzw. Nativschnitte

Methacrylatschnitte

HNO ₃	M ₁ (h)	M ₂ (h)	M ₃ (h)	M ₄ (h)	M ₅ (h)	M ₆ (h)	M ₇ (h)	M ₈ (h)	M ₉ (h)	M ₁₀ (h)
5%	0	4	23,5	27,75	31	39,5	44	48	72,75	94,5
10%	0	4	23,5	27,75	32,5					
15%	0	4	23,5	27,75						
20%	0	4	23,5							
25%	0	4	23,5	27,75	31*					
30%	0	4	23,5	27,75	31*					

Nativschnitte

HNO ₃	M ₁ (h)	M ₂ (h)	M ₃ (h)	M ₄ (h)	M ₅ (h)	M ₆ (h)	M ₇ (h)	M ₈ (h)	M ₉ (h)	M ₁₀ (h)
5%	0	4	23,5	27,75	31	39,5	44	48	56,5	79
7,5%	9,5	9,75	10	10,5	11,5	12,5	13,5	14	15	
10%	9,5	9,75	10	10,5	11,5					
15%	9,5	9,75	10	10,5*						
20%	9,5	9,75	10	10,5*						

*noch immer Kalk feststellbar, jedoch Präparate bereits durch Hydrolyse unbrauchbar!

3mm dicke Methacrylatschnitte und gleichdicke Nativschnitte werden verschiedenen Säurekonzentrationen (5%ige-30%ige HNO₃) ausgesetzt. Nach festgesetzten Zeitpunkten werden Mammographieaufnahmen (M₁-M₁₀) gemacht, bis keine Kalksubstanz mehr feststellbar ist. Es zeigt sich, daß höhere Konzentrationen zunächst kürzere Entkalkungszeit ermöglichen, aber ab einem bestimmten Grad zur Zerstörung des Präparats führen. Nativschnitte werden insgesamt zwar schneller entkalkt als

Methacrylatschnitte, sind aber wesentlich empfindlicher gegen Säurehydrolyse. Die so entstandenen Verdünnungskurven siehe nachstehende Abbildung 1.

Tabelle 3

Einwirkung gleicher Säurekonzentrationen (10%ige und 15%ige HNO_3) auf verschieden dicke Methacrylatschnitte

10%ige HNO_3

Dicke (μm)	M_1 (h)	M_2 (h)	M_3 (h)	M_4 (h)	M_5 (h)	M_6 (h)	M_7 (h)	M_8 (h)	M_9 (h)	M_{10} (h)
200	1									
250	1	1,5	1,6							
450	1	1,5	1,6	2,0						
1000	1	1,5	1,6	2,5	3					
1260	1,5	2,5	3,5	4,5						
2120	1,5	2,5	3,5	4,5	6,75	7,5	8,5			
3000	1,5	2,5	3,5	4,5	6,75	7,5	8,5	10	11	12

15%ige HNO_3

Dicke (μm)	M_1 (h)	M_2 (h)	M_3 (h)	M_4 (h)	M_5 (h)	M_6 (h)	M_7 (h)	M_8 (h)	M_9 (h)	M_{10} (h)
1040	3	3,25								
1480	3	3,25	3,5	3,75						
1700	3	3,25	3,5	3,75	4	4,3	4,75			
2500	3	3,25	3,5	3,75	4	4,3	4,75	7,5	9,5	9,75

Verschieden dicke Methylacrylatschnitte (200-3000 μm) wurden konstanten Säurekonzentrationen ausgesetzt (10%ige und 15%ige HNO_3).

Nach festen Zeitpunkten erfolgte Mammographieaufnahmen (M_1 - M_{10}) zeigten den Grad der Entkalkung. Demnach ergibt sich lineare Abhängigkeit der Entkalkungsdauer von der Schnittdicke (siehe Ab-

bildung 2) mit geringen Unterschieden zwischen 10%iger und 15%iger HNO_3 .

Abbildung 1

Zeitdauer der Entkalkung gleich dicker (3mm) Knochenschnitte mit verschiedenen Säurekonzentrationen in Stunden

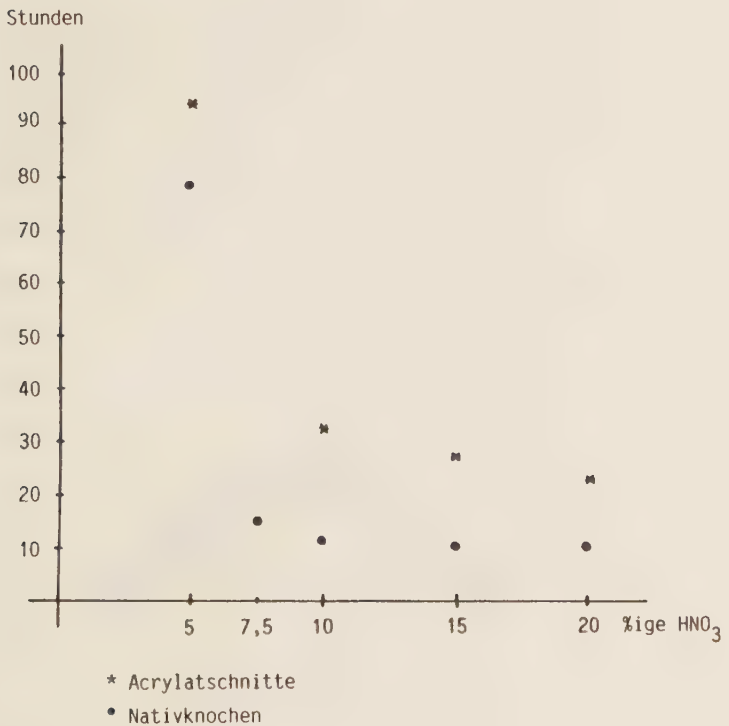
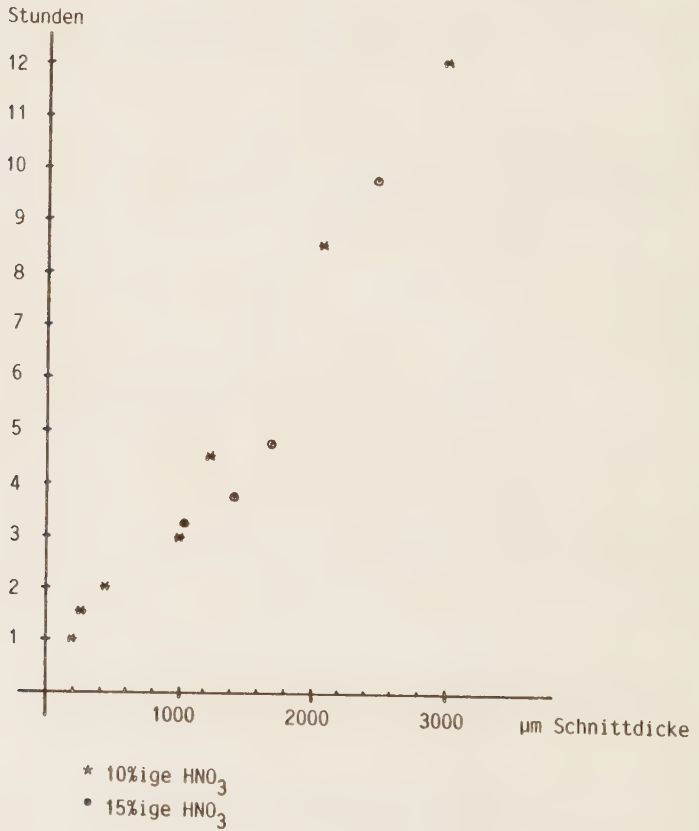


Abbildung 2

Abhängigkeit der Entkalkungsdauer von der Schnittdicke (Methylmethacrylat) bei konstanter Säurekonzentration (10%ige und 15%ige HNO_3)



3.2. Photodokumentation

Die dargestellten Präparate zeigen, daß Knochen mit der angegebenen Methode durchsichtig gemacht werden können (Abb.13-15). Das dreidimensionale Gefäßverteilungsmuster wird im Fotodokument zweidimensional abgebildet (Abb. 9, 10, 13-15). Im Stereomikroskop verändern sich die Bildkontraste je nach Hintergrund und Lichtapplikation. Die einzelnen Techniken dazu werden gezeigt (Abb. 5-8). Wandbeschläge durch Ruß in Arterienwänden können Bariumsulfatfüllungen überdecken. Dies wird durch röntgenologische Kontrolle mittels Mikroangiogramm vermieden (Abb. 11, 12). Die Technik der Plastination ganzer Rattenextremitäten mit anschließender Zerlegung in Einzelschnitte, Schnittentkalkung und Nachplastination ermöglicht sowohl ein anatomisches Gesamtbild in der Übersichtsvergrößerung (Abb. 13) als auch das Detailstudium bis hin zu den intracorticalen Gefäßen bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 14).

3.2.1. Präparaturrichtung und stereomikroskopische Untersuchungstechnik

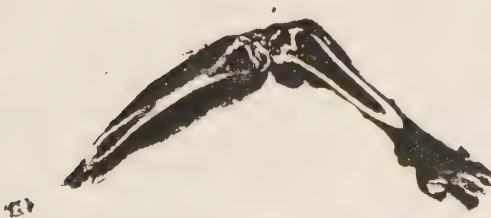


Abbildung 3

In Epoxidharz Biodur E₁ eingebettete, unentkalkte untere Extre-

mität einer Wistar-Ratte

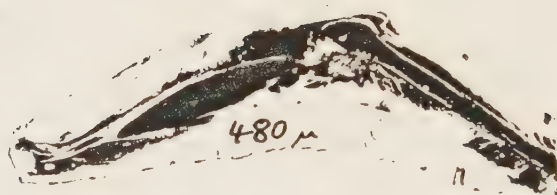


Abbildung 4

Der in Abb. 3 dargestellten, plastinierten Rattenextremität entnommener Längsschnitt, schnittentkalkt und nachplastiniert, danach mit der Ultrafräse auf 480μm Dicke abgefräst

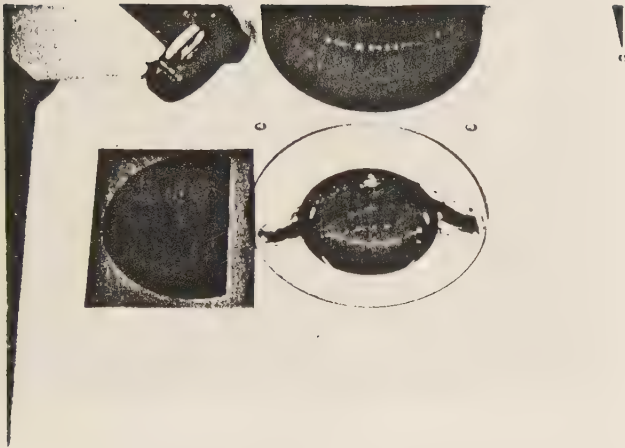


Abbildung 5

Stereomikroskopische Betrachtung des Schnittes aus Abb. 4 im Durchlicht (wahlweise im Auflicht), danebenliegend das zugehörige Mikroangiogramm.

Wird im Stereomikroskop ein transparenter Gewebe- bzw. Knochenschnitt im Durchlicht betrachtet, so werden sowohl Venen als auch Arterien schwarz dargestellt. Im Auflicht erscheinen dann die mit Bariumsulfat gefüllten Arterien weiß, im Kontrast zu den mit schwarzem Ruß gefüllten Venen. Bei Betrachtung des Schnittes im Auflicht mit schwarzem oder weißem Hintergrund lassen sich die Kontraste noch erhöhen.

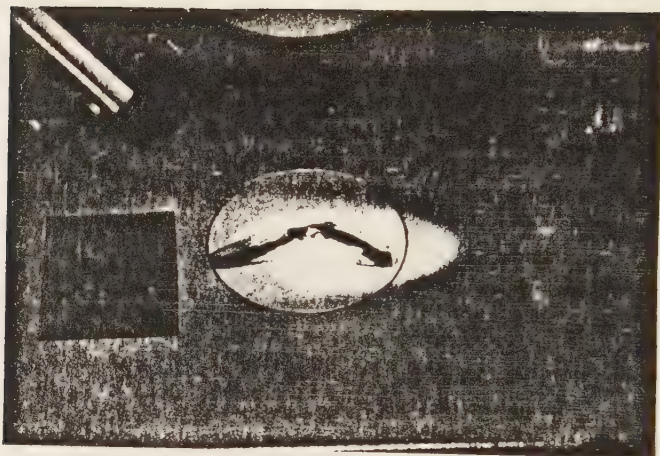


Abbildung 6

Wie Abb. 5 im Auflicht vor weißem Hintergrund



Abbildung 7

Wie Abb. 5 im Auflicht vor schwarzem Hintergrund

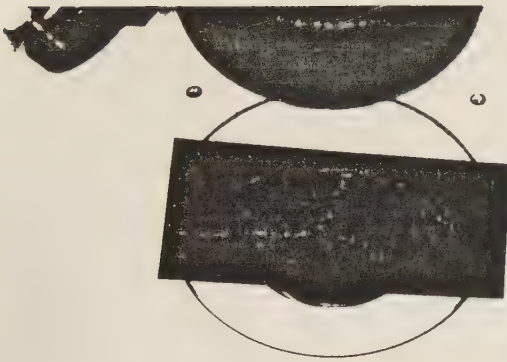


Abbildung 8

Stereomikroskopische Betrachtung von Schnitt und Mikroangiogramm im Auflicht, übereinanderliegend und zur Deckung gebracht. Anordnung für das in 2.6. beschriebene Differenzverfahren zur Darstellung von Arterien und Venen.

3.2.2. Stereomikroskopische Gefäßdarstellungen in der zweidimensionalen Fotodokumentation

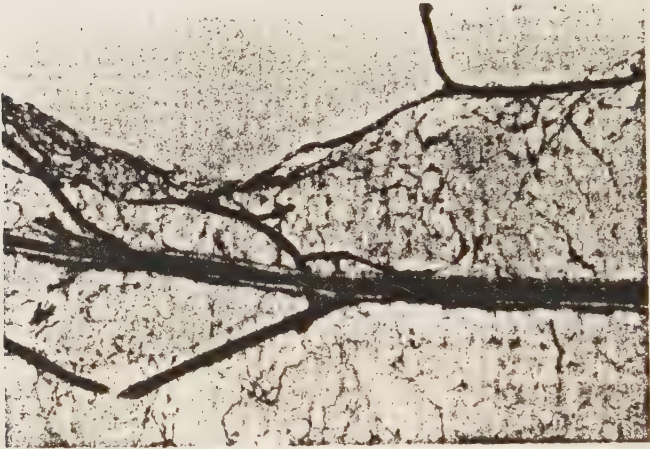


Abbildung 9

Ein 300µm dicker Längsschnitt durch den plastinierten Femur eines Schäferhundes, schnittentkalkt und nachplastiniert, im Durchlicht. Im Bild dargestellt sind großkalibrige Markraumgefäße.

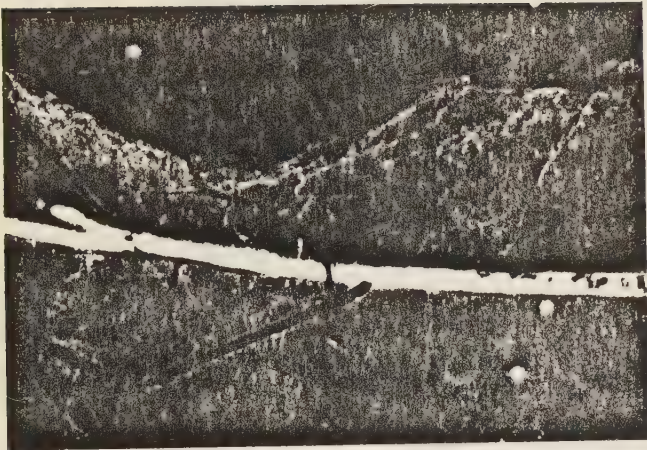


Abbildung 10

Dieselbe Bildeinstellung wie Abb. 9, jetzt im Auflicht.
Die in Bildmitte längsverlaufende Arterie ist an ihrer Bariumsulfat-Füllung erkennbar. Davon abzweigende Arteriolen sind schwarz dargestellt. Mit dieser Bildtechnik läßt sich nicht entscheiden, ob die Arteriolen mit Ruß gefüllt oder trotz Bariumsulfat-Füllung durch einen Rußbeschlag der Wand schwarz gefärbt sind, so daß sich hier eine röntgenologische Kontrolle durch das Mikroangiogramm anschließt.

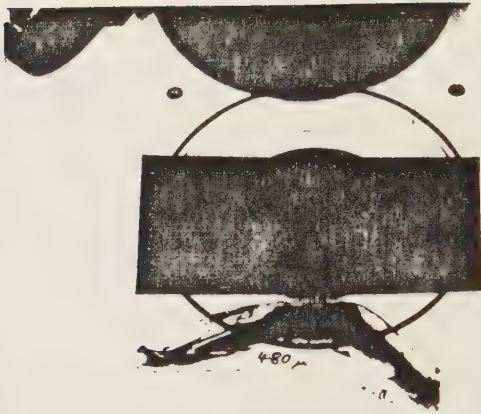


Abbildung 11

Betrachtung des Mikroangiogramms eines Längsschnittes durch die untere Extremität einer Ratte im Durchlicht als röntgenologische Kontrolldarstellung der Bariumsulfat-Füllung

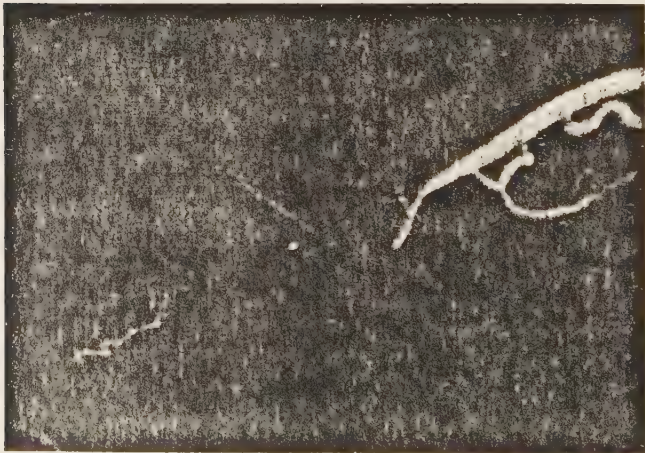


Abbildung 12

Im Mikroangiogramm dargestellte Arterien mit Bariumsulfat-

Füllung im Durchlicht (Anordnung von Abb. 11)



Abbildung 13

Ausschnitt aus dem in Abb. 4 dargestellten schnittentkalkten und nachplastinierten Längsschnitt einer Rattenextremität im Stereomikroskop im Durchlicht. In Bildmitte der distale Femur und die Patella. Tief schwarz erscheinen die mit Ruß gefüllten Markraumsinus.

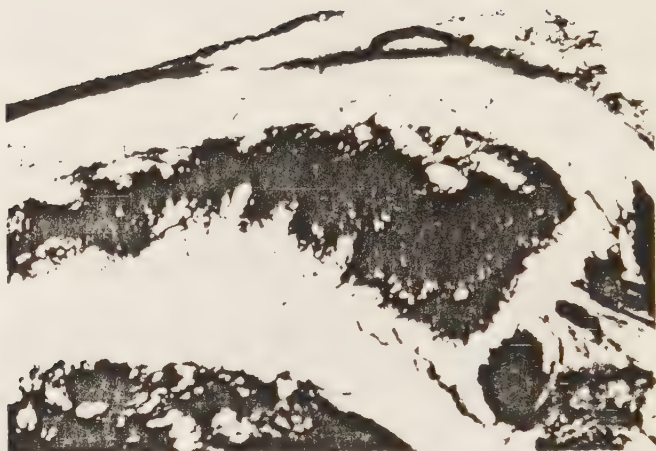


Abbildung 14

Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 13: die längsgeschnittene Rattenpatella mit dichten Gefäßbüscheln des Markraumes und baumartig sich verzweigenden Gefäßen der Corticalis. Deutlich erkennbar das Patellagleitlager im unteren Bilddrittel.

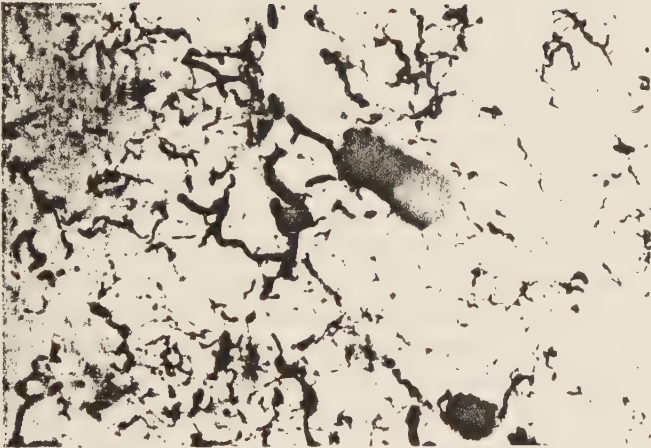


Abbildung 15

Dem in Methylmethacrylat eingebetteten Radius eines Schafes wurde ein 450µm dicker Querschnitt entnommen, schnittentkalkt und mit Kanadabalsam zwischen Objektträger und Deckglas eingedeckt. Die quergetroffene Markraumarterie ist im Auflicht an ihrer weißen Bariumsulfat-Füllung erkennbar, die Arterienwand ist mit einem dünnen Saum von Ruß beschlagen. Aus dem Markraum verzweigen sich die Gefäße in die Corticalis (Bildmitte). Das Mark selbst weist eine netzartige Gefäßstruktur auf (rechte Bildhälfte).

Da der Schnitt 0.45mm dick ist, können die Gefäße nur in einer Schicht scharf dargestellt werden, die tiefer bzw. höher gelegenen Gefäße erscheinen als feine dunkle Linien, solange sie noch im Tiefenschärfenbereich liegen, darüberhinausreichend werden sie unscharf. Mit dem Stereomikroskop können je nach Fokussierung die einzelnen Schichten durchgemustert werden.

4. Diskussion

4.1. Mikroangiographie mit Ruß und Bariumsulfat

Die Gefäßdarstellung mit Kontrastmitteln ist sowohl tägliche klinische Routine als auch ein wichtiges morphologisches Untersuchungsverfahren in der experimentellen Chirurgie. Die in vivo-Röntgentechnik ist speziell beim Knochen aufgrund seines Kalksalzgehaltes nicht möglich. Die Entkalkung ist Voraussetzung für das Mikroangiogramm, das seinerseits nur eine zweidimensionale Darstellung ermöglicht. Das dreidimensionale Bild im Stereomikroskop jedoch erfordert die Präparation nach dem Spalteholzprinzip, das bisher, ebenso wie das Mikroangiogramm, nicht quantifizierbar ist. Ziel ist es nun, durch eine zunehmende Standardisierung der Methode die Voraussetzungen für die Quantifizierung der Mikroangiographie zu schaffen.

Bei der Diskussion der Standardisierbarkeit sind vor allem die folgenden wesentlichen Gesichtspunkte in Betracht zu ziehen.

4.1.1. Übereinstimmung des Mikroangiogramms mit den in vivo-Verhältnissen

Bei allen Möglichkeiten einer Gefäßmarkierung stellt sich grundsätzlich die Frage nach dem Grad der Übereinstimmung der Mikroangiogramme mit den in vivo-Verhältnissen. Tiefergehende experimentelle Untersuchungen zu diesem Thema gibt es bisher hauptsächlich über das Bariumsulfat. Frik und Persch (4) berichten über die Abhängigkeit des Arterienkalibers vom Kontrastmitteltyp. Dabei werden wässrige und ölige Jodlösungen mit der Bariumsulfatsuspension verglichen: bei Bariumsulfat seien die Gefäßkaliber gegenüber physiologischen Verhältnissen weiter. Lundskog (15) unternimmt einen aufwendigen Versuch, bei dem er das mikroskopische in vivo-Bild des Hamstermesenteriums vergleicht mit dem in vivo-Bild unter Bariumsulfat-Perfusion und dem Mikroangiogramm des gleichen Bezirks. Er stellt dabei im Gegensatz zu

Frik und Persch (4) fest, daß bei Bariumsulfat-Injektion eine Verminderung des Gefäßquerschnittes um 10-50% auftritt, ebenso kommt es zu umschriebenen Gefäßkontraktionen, die zu Füllungs-unregelmäßigkeiten führen, die er nicht nur im Querschnittsbild, sondern auch im Longitudinalschnitt findet. Ein wichtiger Gesichtspunkt ist auch der Perfusionsdruck, der nach Lundskog im Bereich des physiologischen Druckes liegen muß. Weiterhin beschreibt er, daß nur vereinzelt eine Darstellung der Kapillaren erfolgt. Diese Eigenschaft des Bariumsulfat, nicht kapillargängig zu sein, ist schon bei Rhineland (18,19) beschrieben und wird durch Wandadhäsionen und Mikroembolisierungen des Bariumsulfats erklärt. Insgesamt sieht Lundskog das Bariumsulfat als eine Angiographiesubstanz, die zwar mit Nachteilen behaftet ist, aber bei Beachtung der systematischen Fehler Informationen über die Mikrozirkulation geben kann.

4.1.2. Spezifität der Gefäßdarstellung

Mit Spezifität der Gefäßdarstellung ist hier gemeint, daß das Kontrastmittel im Gefäß verbleibt und nicht durch die Wand hindurchdiffundiert und das umgebende Gewebe mitfärbt. Dieses Problem steht bei Disulfonblau als Angiographiemedium im Vordergrund, nicht jedoch bei Ruß, Bariumsulfat und Kunststoffen. Diese verbleiben im Gefäß, soweit nicht unphysiologisch hohe Drucke verwendet werden (daher konstante Höhendifferenz Tisch-Infusion von 180cm einhalten). Der Tendenz von Luconyl-Blau, das Gefäß zu verlassen, begegnet Reinhold (17), indem er mit einem Gemisch aus Luconyl-Blau, Styrenebutadine Latex und Acrylic-latex angiographiert: ersteres bindet das Luconyl-Blau, so daß dieses nicht mehr ins Gewebe diffundieren kann, letzteres führt zum Erhärten des Angiographiemediums.

4.1.3. Vollständigkeit der Gefäßdarstellung (Reproduzierbarkeit)

Der Gesichtspunkt der Vollständigkeit der Gefäßdarstellung wird

von verschiedenen Einflußgrößen bestimmt: Teilchengröße der Substanz, Viskosität, Füllungsdruck und Fähigkeit des Angiographiemediums, in den Gefäßen zu verbleiben, das heißt, nicht mehr herauszulaufen. Kunststoffe zur Angiographie, die nach kurzer Zeit erhärten, verbleiben mit großer Sicherheit im Gefäß, sie laufen nicht über die Schnittfläche aus. Sie sind im allgemeinen visköser als die anderen Medien, was zu Füllungsdefekten im Kapillarbereich führen kann. Beliebige hohe Injektionsdrucke sind nicht anwendbar, da das Medium über arteriovenöse Kurzschlüsse die Kapillarstrecke umgehen kann (deshalb in vivo-Injektionstechnik). Bei Rußangiographien kann ein Auslaufen nur schwer verhindert werden, jedoch die Kombination von Ruß und Bariumsulfat zur Angiographie beseitigt dieses Problem: nachdem das Bariumsulfat durch Wandadhäsion und Verklumpung präkapillär stecken bleibt, dichtet es auf diese Weise von arterieller Seite ab und verhindert damit nach dem Pipettenprinzip (3) das Auslaufen der Rußdispersion. Die Tuschepräparation AN 1 16/1 (Degussa) weist ebenfalls Wandadhäsion auf, zumindest unmittelbar hinter dem Injektionsort im freigespülten Gefäß, nicht jedoch in Bereichen, die systemisch erreicht werden, z. B. in den Darmgefäßen. Das Auslaufen kann weiter vermindert, wenn man bei der Amputation der Extremitäten die Weichteile mit dem elektrischen Messer durchschneidet (zu beachten ist dabei, daß genügende Entfernung vom zu untersuchenden Bereich eingehalten wird). Durch die dabei erfolgende Gefäßdenaturierung und durch die Fixierung der Amputate mitsamt der anhaftenden Muskulatur wird das Auslaufen der Angiographiesubstanzen unterbunden. Die Verwendung von Gelatine zum Andicken der Rußlösung ist damit nicht notwendig, sie hat sich als nachteilig erwiesen, da durch ein Verstopfen von Kapillaren mit Gelatineteilchen bzw. durch Ruß, der mit der Gelatine verklumpt, die anschließende Bariumsulfat-Injektion unmöglich wird. Deshalb kommen auch Occlusionstechniken, etwa mit Latex-Microsphären, für die Methode mit zwei Kontrastmittelinjektionen nicht in Frage. Werden diese Microsphären alleine benützt, so läßt sich das Kapillarbett selektiv darstellen.

Trotz der bereits mehrfach erwähnten Eigenschaft des Bariumsulfats, die Kapillarstrecke trotz einer Teilchengröße von $0,5\mu\text{m}$ nicht zu passieren, gelingt jedoch die Füllung der präkapillären arteriellen Gefäße regelmäßig im Gegensatz zu manchen Kunststoffen, die zwar makroskopisch ansprechende Resultate zeigen, aber auf mikroskopischer Ebene bei unterschiedlichen Gefäßquerschnitten Halt machen. Besonders ausgeprägt ist diese Eigenschaft bei schnell erhärtenden Kunststoffen (Technovit), die bei etwas zu geringer Injektionsgeschwindigkeit vorzeitig erstarren und somit nach distal keine Gefäßdarstellung mehr ermöglichen. Dies zwingt dazu, bei der Angiographie rasch, das heißt mit unphysiologisch hohem Druck zu injizieren, was das Bild der Gefäßverteilung verfälscht. Niedrigvisköse und langsam erhärtende Kunststoffe können andererseits vor dem Erhärten wieder herauslaufen, wenn man nicht die Weichteile mit dem (verschlossenen) Katheter beläßt bis nach dem Erhärten. Das Abpräparieren bei erhärtetem Kunststoff führt aber zum Zerschneiden feiner periostaler Gefäße durch ihre starre Füllung, es sei denn, man weicht auf Thermoplaste oder Silikon aus. Versuche mit Epoxidharzen zeichnen hier aber einen neuen Weg ab: In Ergänzung zur Plastination versuchen wir jetzt farbige Epoxidharze zur Angiographie (Biodur E₂₀₂₀ mit Jod zur Kontrastgebung) mit den hier günstigen thermoplastischen Eigenschaften zu verwenden (7). Bezüglich des Gesichtspunktes der Viskosität hat sich für das Bariumsulfat die 30%ige Lösung bewährt, höher prozentige Ansätze sind zu viskos und erfordern wiederum zu hohem Druck bei der Injektion. Auch bei der Rußdispersion ist die Viskosität von der Konzentration abhängig. 30%ige und 50%ige Rußlösungen verstopfen das Gefäßsystem und behindern die nachfolgende Bariumsulfat-Injektion. Die 10%ige Lösung hat sich als günstig erwiesen. Die Rußdispersion AN 1 16/1 ist die feinste Präparation der Firma Degussa. AN 1-25/L und P130 sind ebenfalls verwendbare Rußdispersionen, führen aber zu einer weniger vollständigen Füllung im Kapillarbereich. Ruß ist nicht mit Tusche gleichzusetzen, Bindemittelzusätze können sich hier als nachteilig er-

weisen. Der Vorteil großer Feinheit von AN 1 16/1 (Sekundärteilchengröße maximal 1µm) bringt andererseits den Nachteil mit sich, daß im arteriellen Schenkel trotz Bariumfällung Rußpartikel aufgrund der Wandadhärenz dieser Präparation an den Gefäßwänden zurückbleiben, was bei den beiden anderen Produkten weniger stark der Fall ist. Die Unterscheidung von Arterien und Venen ist trotzdem möglich mit dem oben beschriebenen Differenzverfahren durch Kombination von stereomikroskopischem Bild und Mikroangiogramm. Eine Differenzierung von Arterien und Venen bei Injektion verschiedenfarbiger Kunststoffe getrennt von arterieller und venöser Seite ist nicht standardisierbar für die selektive Darstellung von Arterien und Venen.

Eine Weiterentwicklung zeichnet sich in der Kombination von Epoxidharz und Bariumsulfat als Kontrastmedien ab. Zusammengefaßt erscheint die Ruß/Bariummikroangiographie als die derzeit am besten standardisierbare Mikroangiographiemethode, die eine Differenzierung von Arterien und Venen zuläßt. Lundskog (15) hat nachgewiesen, daß eine sichere Darstellung des arteriellen Gefäßsystems bis zu einer Lumenweite von 0,05-0,1mm möglich ist.

4.2. Entwässerung

Die Entwässerung durch Gefrier austausch mit technischem Aceton ist mit geringerem Arbeitsaufwand verbunden als die aufsteigende Alkoholreihe und ist für das Gewebe schonender, weil mit weniger Schrumpfung verbunden (nur 10% im Vergleich mit maximal 45% bei Äthanol).

4.3. Plastination

Nach v. Hagens wird bei der Plastination durch Gefrier austausch das Gewebswasser durch Aceton und dieses bei der Imprägnierung durch Kunststoff ersetzt. Auch ein Teil des Gewebsfetts wird herausgelöst, so daß insgesamt also Gewebswasser und Gewebsfett durch Epoxid ersetzt werden. Löst man nun bei der Entkalkung des Knochens

mittels Säure den Hydroxylapatit auf, so tritt an dessen Stelle zunächst Wasser (Wässern der Schnitte nach dem Entkalken). Dieses wiederum wird anschließend durch Aceton und bei der Nachplastination durch Epoxid verdrängt. Letztlich ersetzt man also Hydroxylapatit durch Epoxid. Unter Zugrundelegung dieser Hypothese ist mit dem Verfahren eine Plastination von Knochengewebe per definitionem möglich.

Die präparatorische Aufarbeitung angiographierter Knochen mittels Plastination besitzt gegenüber der Methacrylateinbettung verschiedene Vorteile:

- Die Herstellung von fertigen Präparaten für die mikroskopische Auswertung ist je nach Harzansatz und Größe der Knochenstücke in kürzerer Zeit, unter Umständen in einer Woche zu bewerkstelligen.
- Die Plastination ist weniger arbeitsaufwendig als die Acrylateinbettung, benötigt weniger Einzelschritte und weniger Chemikalien.
- Ungleichmäßige Polymerisation und Blasenbildung bei geringsten Verschmutzungen oder zu raschem Aushärten sind bei Methylmethacrylat oft nur schwer vermeidbar. Nach ausreichender gründlicher Imprägnierung kommen Blasenbildungen bei der Plastination nicht vor.
- Die Gewebeschrumpfung beträgt nach v. Hagens bei der Epoxideinbettung 0,2% im Gegensatz zum Methacrylat mit bis zu 10%.
- Biodur E₁₂ besitzt einen dem Gewebe entsprechenden Brechungsindex von $n_D^{20} 1,550$ (20°C), kann demnach als optisch aufhellendes Medium nach Spalteholz verwendet werden.
- Je nach Mischungsverhältnissen von Harz, Härter und Weichmacher können die Verarbeitungszeit, Polymerisationsgeschwindigkeit, optische und thermoplastische Eigenschaften des Epoxidharzes in weiten Grenzen variiert werden, je nach dem, ob man dünne oder dicke Schnitte herstellen, ob man fräsen oder weitere Histologie betreiben will.
- Schnitte in beinahe beliebiger Dicke können durch Entkalken, Entwässern und Nachplastination durchsichtig gemacht werden,

während die Eindeckmethode mit L₁₅ oder Kanadabalsam bei Acrylat-schnitten für Schnittdicken von 500µm und mehr technisch nur schwer durchführbar sind. Die Schnittdicke von 100µm bietet zu geringe Raumtiefe im Stereomikroskop, wenngleich die Einbettung mit L₁₅ auf Objektträger hier sehr leicht durchzuführen ist.

- Die Möglichkeit, standardisierte Schnitte planparallel und von definierter Dicke aus Epoxidblöcken herzustellen durch nachträgliche Überarbeitung der einzelnen Stücke mit der Ultrafräse ist Voraussetzung für die Quantifizierung der Mikroangiogramme.
- Die Nachplastination führt zu Präparaten ohne Glasbestandteile, was die weitere Verarbeitung (Fräsen, Probeentnahme zur Histologie) ermöglicht.

Nachteilig ist bei den Epoxidansätzen mit

- Aminhärten, daß sie nicht mehr aus dem fertigen Schnitt herausgelöst werden können, also eine Deplastination mit anschließender histologischer Färbung nicht möglich ist.
- Anhydridhärten die große Restwasserempfindlichkeit, längere Polymerisationsdauer und Unmöglichkeit, von Glas abgeformt zu werden, auch bei Anwendung von Trennmitteln.

4.4. Entkalkung

Die Entkalkung von Knochenschnitten im eingebetteten Zustand ist zeitsparend und besonders gewebeschonend für Periost und Weichteile und erlaubt die Durchführung verschiedener Untersuchungstechniken (Fluorochromierung, Mikroradiographie, Mikroangiographie, Stereomikroskopie) auf eng begrenztem Raum, an einem Präparat in definierter Schnittebene, was bisher in dieser Exaktheit unmöglich war. Salpetersäure ist der Ameisensäure bzw. EDTA vorzuziehen, ersterer aus Kostengründen, letzterer wegen der Eigenschaft von EDTA, das Barium komplex zu binden und herauszulösen. HNO₃ in 5%iger Konzentration beansprucht längere Zeit zur Entkalkung als 10%ige Salpetersäure. Höhere Konzentrationen (15-20%) führen durch Hydrolyseeffekte zur Schädigung des Präparats.

4.5. Durchsichtigmachen von Gewebe

Das Durchsichtigmachen entkalkter eingebetteter Knochenschnitte mit der Eindeckung auf Objektträger zu kombinieren bzw. durch die Nachplastation in einem Schritt fertige Dauerpräparate mit transparentem Knochen herzustellen, ersetzt die herkömmliche Spalteholzmethode, macht das Mikroskopieren über in Wintergrünöl schwimmenden Präparaten unnötig.

Abschließend können die Vor- und Nachteile der Ruß/Bariumsulfat-Angiographie mit der beschriebenen Präparationstechnik folgendermaßen gegenübergestellt werden:

Vorteile:

- einfache, spezifische und reproduzierbare sowie standardisierte Technik
- Ausnützung des dreidimensionalen Bildes im Stereomikroskop (siehe Vaskularisation)

Nachteile:

- am Menschen nicht anwendbar (allenfalls an Amputationspräparaten, Übertragbarkeit der Ergebnisse nur unter Beachtung von systematischen Fehlern möglich); dieser Nachteil haftet aber allen Untersuchungsmethoden an, die die Mikrozirkulation des Knochens darstellen
- keine in vivo-Verlaufskontrollen durch herkömmliche Röntgentechnik möglich, nur einmalige Untersuchung (Konsequenz: Verlaufskontrolle am gleichen Individuum nicht möglich, daher zeitliche Sequenzierung unter Verwendung einer größeren Zahl von Untersuchungsobjekten zur Darstellung der pathophysiologischen Änderungen der Vaskularisation erforderlich. Dadurch können aufgrund der Inhomogenität des Untersuchungsmaterials Fehler auftreten.)
- keine intravital-Strömungsverhältnisse beurteilbar wie bei nuklearmedizinischen Untersuchungsmethoden (Mikrosphären Tracer-Technik), die allerdings ihrerseits kein dreidimensionales Bild abgeben
- Durchmischungseffekte von Ruß- und Bariumsulfatlösung sowie Wandadhäsion von Rußteilchen erfordern das aufwendige Differenzverfahren. Die derzeit in Ausarbeitung befindliche Angiographietechnik mit Kombination von Epoxidharzen wie Biodur E₂₀ zur Angiographie mit Barium-

sulfat zeigt keine Durchmischung und Adhäsion, so daß sich hier möglicherweise eine Weiterentwicklung ergibt.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit ist die Darstellung der Entwicklung und die Standardisierung der Technik der Ruß/Bariumsulfat-Angiographie und der histologischen Aufarbeitung des angiographierten Knochens. Die Standardisierung der Methodik ist Voraussetzung für die Quantifizierung dieser morphologischen Untersuchungstechnik. Es ist nicht Ziel, die Methode zu validieren, vielmehr soll ihre Durchführung beschrieben werden. Es stellen sich im wesentlichen drei Grundfragen:

1. Läßt sich das Problem der Inkompatibilität von Untersuchungsmethoden, die eine Entkalkung benötigen oder verbieten, beseitigen?

2. Welche Vorteile hat die weiterentwickelte Methode?

3. Läßt sich die technische Herstellung der Präparate standardisieren?

Die Methodik der Mikroangiographie mit operativer Vorbereitung, eigentlicher Angiographie durch Infusion von Spüllösung, der Ruß- und der Bariumsulfatlösung, sowie die unmittelbar anschließende Amputation durch Durchtrennung und Unterbindung der großen Gefäße bzw. Durchtrennung der Weichteile mit dem Elektromesser wird vorab beschrieben. Dann folgt die Darstellung zweier grundsätzlich verschiedener Weiterverarbeitungsmöglichkeiten, der Methacrylateinbettung und der Plastination. Die dabei erforderlichen Einzelschritte werden für diese beiden grundsätzlichen Möglichkeiten jeweils getrennt abgehandelt. Beiden Methoden gemeinsam ist dann die Schnittentkalkung, unterschiedlich jedoch wieder die Technik der optischen Aufhellung und der Fertigung der Dauerpräparate. Hierfür wird bei der Methacrylateinbettung die Eindeckung auf Objektträger mit Kanadabalsam oder L₁₅, bei der Plastination die sogenannte Nachplastination beschrieben, die ohne Glaseindeckung auskommt. Schnittentkalkung und Nachplastination in Ergänzung zur Plastination machen es möglich, planparallele Präparate mit definierter Dicke und somit standardisierte Gewebeschnitte herzustellen, was bisher für Mikroangiogramme nicht möglich war. Diese können bei einer Schnittdicke von 0,3-1mm mikroradiographiert werden, um nach Entkalkung und Nachplastination in Dauerpräparate umgewandelt zu werden, die sowohl für die Herstellung des Mikroangiogramms als auch für die Stereomikroskopie verwendbar sind. Diesen

Schnitten können wiederum gezielte Proben zur histologischen Weiterverarbeitung entnommen werden. Lediglich die Fluoreszenzmikroskopie erfordert unentkalkte Schnitte von maximal 100µm Dicke. Diese Schnitte können definiert vor der Entkalkung entnommen werden. Insofern ist das Inkompatibilitätsproblem zwar nicht beseitigt, aber doch insofern gelöst, als histologischer Schnitt und dazugehöriges Mikroangiogramm nur um Sägeblattbreite (300µm) auseinanderliegen. Ähnlich der Scheibenplastination (Körper- und Extremitätenscheiben nach v. Hagens) kann man aus Rattenextremitäten mittels Plastination, Zerlegung des gesamten Organs in Längsscheiben, Entkalkung und Nachplastination sehr anschauliche Schnittserien herstellen. Beläßt man dazu den gesamten Weichteilmantel der Extremität, so hat man die Anatomie letzterer makroskopisch und mikroskopisch vor Augen.

Wesentlicher Vorteil ist aber die Standardisierung der Schnittherstellung, die einfache Handhabung und die Entwicklung einer präparationstechnischen Grundlage für die Quantifizierung von Mikroangiogrammen.

Als Nachteil des beschriebenen Verfahrens bleibt das aufwendige Differenzverfahren zu nennen aufgrund von Durchmischungseffekten der Kontrastmittel Ruß und Bariumsulfat. Ein derzeit in Entwicklung befindliches Angiographieverfahren mit Epoxidharz (Biodur E₂₀) und Bariumsulfat verspricht auch ohne die Differenztechnik eine exakte Unterscheidung von Arterien und Venen zu ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

1. van de BERG, A.; DAMBE, T.L.; SCHWEIBERER, L.
Angiographische und mikroangiographische Technik an der Tibia
des Hundes
Angiographie und ihre Fortschritte
Thieme Verlag Stuttgart (1972)
2. DAMBE, T.L.
Revaskularisation der Diaphyse langer Röhrenknochen nach Frak-
tur und Osteosynthese
Inauguraldissertation der Medizinischen Fakultät der Universi-
tät des Saarlandes (1971)
3. EITEL, F.; SEILER, H.; SCHWEIBERER, L.
Vergleichende morphologische Untersuchungen zur Übertragbarkeit
tierexperimenteller Ergebnisse auf den Regenerationsprozeß des
menschlichen Röhrenknochens
Unfallheilkunde 84 (1981) 250-254
4. FRIK, W.; PERSCH, W.F.
Der Einfluß des Kontrastmitteltyps auf das Arterienkaliber in
der experimentellen Angiographie
Röfo 111,5 (1969) 620-629
5. GÖTHMAN, L.
Vascular Reactions in Experimental Fractures
Act. chir. Scand. 284 (1961)
6. von HAGENS, G.
Technische Merkblätter zur Plastination: "Biodur Epoxide für
die Histologie"
Selbstverlag Heidelberg (1984)

7. von HAGENS, G.
Technische Merkblätter zur Plastination: "Biodur Epoxid-Kunststoffe zur Plastination", 11
Selbstverlag Heidelberg (1984)
8. von HAGENS, G.
Emulsifying Resins for Plastination
Der Präparator 25 (1981) 43-50
9. HARMS, J.; van de BERG, P. A.
Die venöse Drainage des langen Röhrenknochens nach Aufbohrung und Marknagelung
Arch. orthop. Unfall-Chir. 82 (1975) 93-99
10. KELLY, P. J.
Anatomy, Physiology and Pathology of the Blood Supply of Bones
J. Bone and Jt. Surg. 50-A (1968) 766-783
11. KLÜMPER, A.
Grundlagen zur intraossären Angiographie am menschlichen Röhrenknochen
Röfo 125,2 (1976) 129-136
12. LARSON, R. L.; KELLY, P. J.; JAMES, J. M.; PETERSON, L. F. A.
Suppression of the Periosteal and Nutrient Blood Supply of the Femora of Dogs
Clin. orthop. 21 (1961) 217-225
13. LEXER; KULIGA; TÜRK
Untersuchung über Knochenarterien
Berlin 1904, A. Hirschwald

14. LEXER

Die Entstehung entzündlicher Knochenherde und ihre Beziehungen
zu den Arterienverzweigungen der Knochen
Arch. klin. chir. 71

15. LUNDSKOG, J.; BRANEMARK, P.J.; LINDSTRÖM, J.

Biomicroscopic Evaluation of Microangiographic Methods
Adv. Microcirc. Vol 1 (1968) 152-160

16. RAHN, B.A.

Die polychrome Sequenzmarkierung
Habilitationsschrift der Universität Freiburg (1976)

17. REINHOLD, H.S.; HOPEWELL, J.W.; van RIJSOORT, A.

A Revision of the Spalteholz Method for Visualizing Blood Vessels
Int. J Microcirc: Clin. Exp. 2 (1983) 47-52

18. RHINELANDER, F.W.; BARAGRY, R.A.

Microangiography in Bone Healing
J. Bone and Jt. Surg 44-A (1962) 1273-1298

19. RHINELANDER, F.W.

Tibial Blood Supply in Relation to Fracture Healing
Clin. Orthop. 105 (1974) 34-81

20. SPALTEHOLZ, W.

Das Durchsichtigmachen als biologische Arbeitsmethode
Handbuch biologischer Arbeitsmethoden 9 (1924) 409-436

21. SWART, B.; DINGENDORF, W.

Experimenteller Beitrag zur optimalen Gefäßdarstellung
Röfo 97,5 (1962) 637-648

22. TRUETA, J.; HARRISON, M.H.M.

The Normal Vascular Anatomy of the Femoral Head in Adult Man
J. Bone and Jt. Surg 35-B (1953) 442-461

23. WRAY, J.B.; LYNCH, C.J.

The Vascular Response to Fracture of the Tibia in the Rat
J. Bone and Jt. Surg 41-A (1959) 1143-1148

7. Anhang: Arbeitsanweisung zur praktischen Durchführung

VERSUCHSTIERE	Wistar-Ratten, 200-250g, weiblich Schäferhunde, 3-4 Jahre, männlich Texelschafe, 4 Jahre, weiblich Haltungsbedingungen: 22°C $\pm$ 2°C, 55% Luftfeuchtigkeit $\pm$ 5% klimatisierte Tierlabors im offenen System Futter: pellettiertes Fertigfutter bzw. Dosenfutter Schafe: Weidehaltung
NARKOSE	Hund: Prämedikation mit 1% Vetranquil i.m. 1 ml/10kg Kgw Narkose mit Nembutal/Narkoren i.v. 10 ml /25kg Kgw vorsichtshalber intubieren! Schaf: Prämedikation mit Rompun i.m. 10 ml/45kg Kgw Narkose wie beim Hund Ratte: Ätherkurznarkose (Äthertopf) 2-3 ml Chloralhydrat i.p.
OPERATION	Bedarf: anatomische und chirurgische Pinzette, Präparierschere, spitze Schere, Skalpell, Klemmen, Unterbindung, Kompressen, Luer- Ernährungssonde 1,5mm (oder Braunüle 0,70mm)
ANGIOGRAPHIE	pro Extremität: 3 Plastikflaschen Ringerlösung (500ml) 5000 E Heparin 50ml Rußdispersion AN 1 16/1 (50ml Ringer abziehen) 150ml Mikropaquesuspension (150ml Ringer abziehen) 50ml-Spritzen (je eine für Ruß bzw. Barium)

2 filterlose Infusionsbestecke (eines für die Spül-
lösung, wird auf Ruß umgesteckt, eines für Barium-
sulfat)

Achtung: erst kurz vor der Angiographie die Barium-
sulfatlösung an den Ständer hängen, um ein
Absetzen im Infusionsbesteck zu verhindern
Dreieckstisch, Infusionsständer (180cm Differenz
zwischen Op-Tisch und Ständerhöhe)

EXARTIKULIEREN Skalpell, chirurgische Pinzette, Unterbindung (für
die großen Gefäße); exartikulieren und enthäuten,
markieren!

FIXATION 50% iges Äthanol, Glasbottiche mit Deckel, über
24h danach Weichteile abpräparieren (Periost scho-
nen) und Knochen 14 Tage in frisches 50%iges Äthanol
legen (kleine Knochen, z.B. Rattenextremitäten,
können sofort entwässert und plastiniert werden)

WEITERE PRÄPARATION UNTER VERWENDUNG VON METHYLMETHACRYLAT:

ENTWÄSSERUNG mit aufsteigender Alkoholreihe:
Glasgefäße (z.B. Marmeladengläser mit Schraub-
deckel) werden mit den verschiedenen Alkohollösun-
gen gefüllt und beschriftet (50%, 70%, 80%, 90%,
96%, 100%). Den absoluten Alkohol nach jedem Durch-
gang erneuern. Danach folgen drei Stufen Methanol
für je einen Tag (bei anschließender Acrylatein-
bettung)

ACRYLATEIN-
BETTUNG Infiltrieren des Gewebes im Exsikkator bei 70mm Hg
(Spiegelglasmanometer nach Bennert)
Zeitschema:
1. Methanol p. A. 1Tag
2. Methylmethacrylat, 70mm Hg, über Nacht
3. Methylmethacrylat erneuern, 70mm Hg, 1 Tag

(bei großen Knochenstücken nochmal erneuern
und bei 70mm Hg über Nacht stehen lassen)

4. Methylmethacrylat-Gemisch, 70mm Hg, über Nacht
(bei großen Präparaten einmal erneuern für einen
weiteren Tag)

5. Ausgießen und Polymerisieren (rund zwei Tage)

Methylmethacrylat-Gemisch: MMA entstabilisiert 100ml

Plastoid N 25ml

Benzoylperoxid (getrocknet) 8g

(im Kühlschrank bei 4°C 2 Wochen haltbar)

zu 4.: jeweils frische saubere Gläschen verwenden

zu 5.: Gefäße luftdicht verschlossen im Wasserbad in
den Wärmeschränk bringen, 35°C

Entstabilisieren des MMA (nach Prof. Burckhardt):

Acrylat zweimal durch zwei mit Aluminiumoxid (ca.
15cm hoch) gefüllte Chromatographiesäulen laufen
lassen. Boden der Säulen vor dem Einfüllen des Al_2O_3
mit Filterpapier auslegen.

Reinigen der Säulen: gründlich mit Leitungswasser,

Aqua dest und danach mit Metha-
nol durchspülen

Trocknen des Benzoylperoxids:

auf offener Petrischale im Wärmeschränk bei 50°C

1 Stunde

zu 5.: Zum Ausgießen eignen sich gut die luftdicht
verschließbaren Tuppergefäße.

LABORBEDARF

2 Chromatographiesäulen, 45cm hoch, 22mm Durchmesser
mit Schliff am oberen Rand, Fritte (Glasfilter) Körnung I
2 Rundkolben, 500ml mit Schliff zum Aufsetzen auf die
Säulen

Gefäße zum Ausgießen

1 Stativ mit 1 Bürettenklemme doppelt

1 Exsikkator, 25cm Durchmesser mit Deckel und Por-
zellanplatte

- 1 Spiegelglasmanometer nach Bennert
- 1 Wasserstrahlpumpe, Vakuumschlauch

REAGENZIEN

Methacrylsäuremethylester p. A.
(mit 100 ppm Hydrochinon stabilisiert)
Aluminiumoxid Woelm basisch zur Säulenchromatographie Aktivität I
Plastoid N
Benzylperoxid p. a., mit 25% H₂O angefeuchtet
Phosphorpentoxid (Trockenmittel für Exsikkator)
Exsikkatorfett

SCHNEIDEN

- grobes Zurechtschneiden mit einer Bandsäge
- Schnitte von 50µm bis 1mm und mehr mit der Innenlochsäge (Sägemikrotom) (Fa. Leitz)
- Polycutdünnschnitte ca. 10µm (Hartmetallmikrotom Fa. Jung) / Beschriften nicht vergessen!

ENTKALKEN

10%ige HNO₃ in flachen Glasgefäßen
100µm-Schnitte: ca. 1 Stunde
1000µm-Schnitte: ca. 3 Stunden
anschließend 1 Stunde wässern

ENTWÄSSERN

aufsteigende Alkoholreihe: für je 1 Stunde 50%, 70%, 80%, 96%, 100%

EINDECKEN

(Acrylatschnitte)

Präparate aus dem Alkohol herausnehmen, kurz abtropfen lassen und mit L₁₅ eindecken (100µm-Schnitte);
Dickere Schnitte (500µm) eventuell in Xylol durchweichen lassen (3h) oder direkt mit Kanadabalsam eindecken
Technik des Eindeckens:
großer Objektträger (5cm x 7,5cm), 1-2 Tropfen Eindeckmittel daraufgeben, Präparat auflegen, mit Eindeckmittel überschichten, mit Deckglas ab-

decken (langes schmales Deckglas verwenden, 2,5cm x 7,5cm, an jedes Ende einen Bleiklotz stellen; in diesem Zustand 3 Tage trocknen lassen)

WEITERE PRÄPARATION UNTER VERWENDUNG DER PLASTINATION:

ENTWÄSSERN

mit Gefrier austausch:

Aceton und Knochen getrennt auf -25°C vorkühlen

3 Wochen: erstes Acetonbad (reichlich Volumen!)

1 Woche: zweites Acetonbad

3 Tage: drittes Acetonbad (kann wiederverwendet werden für erstes Bad)

Gefäße: Tupperware (acetontest, mit Deckel)

Edelstahltopfe (Haushaltswaren) mit Deckel

Achtung: Aceton ist flüchtig und entflammbar!

Gefriertruhenbeleuchtung entfernen!

Kleine Knochenstücke (Rattenextremitäten, 1cm dicke Scheiben) können in einer Woche entwässert werden (3 Acetonbäder für 5 Tage, 2 Tage, 1 Tag)

Nach der Acetonentwässerung:

Methylenchlorid: entfettet die Präparate und kann leichter abgesaugt werden als Aceton (bei Verwendung einer Wasserstrahlpumpe vorteilhaft)

PLASTINATION (20) Anschließend an den Gefrier austausch bzw. Methylenchlorid (Raumtemperatur!) wird das Präparat direkt ins Harzgemisch gelegt: flache rechteckige Tuppergefäße (ohne Deckel); Knochen nebeneinanderlegen, mit Harz übergießen

Imprägnierung:

Aceton im Exsikkator absaugen: der Exsikkatordeckel besitzt einen Hahn für die Zuluft, der Exsikkatortopf ist über eine gesonderte Öffnung durch einen Vakuumschlauch mit dem Spiegelglasmanometer verbunden, dieses wiederum mit der Wasserstrahlpumpe (oder besser: Vakuumpumpe, größere Saug-

kraft, konstant einstellbar)

1. 3-4 Stunden saugen bei 35 mm Hg Druck
2. 12-24 Stunden saugen bei 15 mm Hg Druck
3. für die restliche Zeit Druck weiter reduzieren (bis mindestens 5 mm Hg)

Achtung: saugt man zu langsam/zu schwach, so verbleiben Acetonreste im Präparat, die durch die Polymerisationswärme ausgetrieben werden und zum Blaseneinschluß führen; saugt man zu abrupt, so kann das Harz nicht auf dem gleichen Wege ins Präparat eindringen und es kommt zu ungleichmäßiger Imprägnierung

Polymerisation:

bei 50°C im Wärmeschrank (beginnen, wenn keine Acetonblasen mehr aufsteigen)

Abformen:

sobald die Polymerisation abgeschlossen ist, werden die Blöcke herausgeklopft

Achtung: bei 50°C im Wärmeschrank erscheinen auch fertige Polymerisate weich aufgrund der thermoplastischen Eigenschaften des Epoxids (vor dem Abformen abkühlen!)

HARZGEMISCHE

ANHYDRIDHÄRTER:

Biodur E₁₂ 100g E₁₀₁₀-Zusatz möglich

Biodur E₆ 50g

Biodur E₆₀₀ maximal 1 Volumen-%
(Beschleuniger)

Dauer des Absaugens ca. 3 Tage

Für größere Knochenstücke geeignet, Deplastination mit 10% Na-Methylat

Restwasser unter 1%!

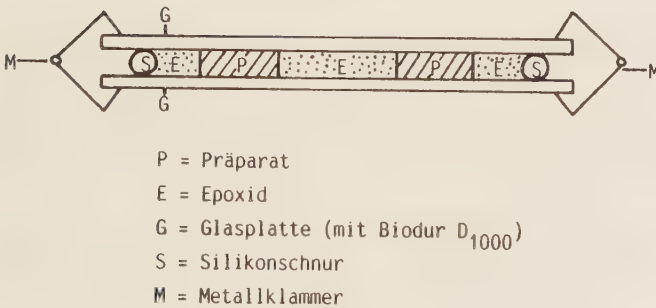
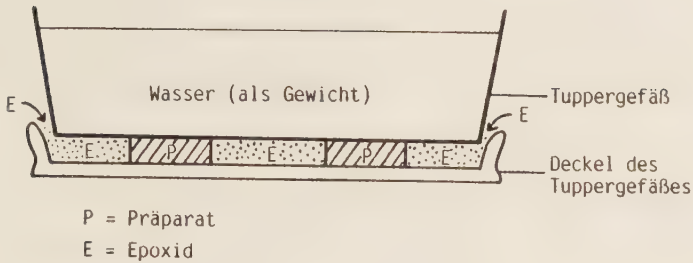
AMINHÄRTER:

Biodur E ₁₂	100g	100g	100g
Biodur E ₁	30g	30g	30g
Biodur E ₁₀₁₀	--	10g	20g
	relativ hartes Endprodukt, günstig für Nachplastination oder Polycutschnitte	mittelhart, günstig für das Sägemikrotom	zum Schneiden im Mikrotom etwas zu weich
Absaugen des Acetons	über Nacht	in maximal 1,5 Tagen	in maximal 3 Tagen
Schneidfähig (abformbar)	2 Tage	5-7 Tage	8-10 Tage
Präparate	für dünne Schnitte und Präparate bis 5mm	Präparate bis maximal 1cm Durchmesser	

wenig restwasserempfindlich, vom Glas abformbar mit Trennmittel Biodur D₁₀₀₀, Deplastination unmöglich;
Achtung: beim Mischen des Harzansatzes: Harz - Weichmacher - Härter - Beschleuniger als Reihenfolge, bei jedem Schritt: gründlich ca. 5 min. umrühren! (von Hand! nicht mit dem Magnetprüher!) Wird das relativ stark visköse Gemisch nicht richtig gerührt, so entstehen völlig unbrauchbare Polymerisate; beim Rühren entstandene Luftblasen im Exsikkator absaugen.)

LABORBEDARF	1 Exsikkator mit 2 Hähnen 1 Vakuumschlauch 1 Spiegelglasmanometer nach Bennert 1 Wasserstrahlpumpe oder Vakuumpumpe (1,5m ³ /h) verschiedene Tuppergefäße zum Ausgießen (ca. 12cmx 12cmx5cm)
REAGENZIEN	Biodur Epoxidharz E ₁₂ Biodur Härter E ₁ + E ₆ Biodur Beschleuniger E ₆₀₀ Biodur Weichmacher E ₁₀₁₀ Biodur Trennmittel D ₁₀₀₀ technisches Aceton und Dichlormethan
SCHNEIDEN	siehe Methacrylatschnitte
ENTKALKEN	siehe Methacrylatschnitte
ENTWÄSSERN DER EPOXIDSCHNITTE	80 Teile Aceton + 20 Teile E ₁₀₁₀ bei -25°C über Nacht, dann mit neuer Lösung für weitere 3 Stunden
NACHPLASTINATION	entwässerte Präparate mit schnellpolymerisierendem Harzansatz nachimprägnieren (z.B. 100g E ₁₂ + 30g E ₁ , ohne Weichmacher) Imprägnieren: Gemisch in einem Einweg-Glasgefäß an- rühren, Präparate hineinlegen und ca. 1 Stunde bei 5 mm Hg bis 0 mm Hg im Exsikkator absaugen Ausgießen: in dünner Schicht, nebeneinanderliegend, übergießen (mit dem Harz aus dem oben er- wähnten Einweg-Glas)

Beispiele für Anordnungen zum Ausgießen:



In unten dargestellter Anordnung wird die Silikonschnur U-förmig eingelegt, dann das Ganze senkrecht gestellt mit nach oben offenem U; danach Einfüllen des Harzes (Scheibenplastination nach v. Hagens).

Abformen: unter fließendem warmem Wasser wie eine Haut vorsichtig abziehen, glatt streichen, abkühlen

Präparate einzeln mit der Schere ausschneiden (in erwärmtem Zustand): das jeweilige Präparat zwischen zwei Objektträger klemmen (mit Daumen und Zeigefinger) und rundherum abschneiden, nochmal fest zusammendrücken und abkühlen; in Objektträgermappen aufbewahren

WEITERE BEARBEITUNG

- Dünnerfräsen mit der Ultrafräse: planparallel mit mikroskopisch hochfeiner Oberfläche
- Deplastinieren (10% Na-Methylat löst das Epoxidharz aus) und wie üblich histologisch färben

BEZUGSQUELLEN FÜR DIE REAGENZIEN UND LABORGERÄTE:

- Aceton, Äthanol, HNO_3 , Methanol, Methylenchlorid: Chemikalienfachhandel
- Aluminiumoxid, basisch, Aktivität I: Woelm Pharma GmbH&Co, 3440 Eschwege
- Bandsäge: Fachhandel
- Benzoylperoxid zur Synthese: Merck Art. Nr. 801641
- Biodur- Harze etc.: Dr. Gunther v. Hagens, Jahnstr. 8, 6900 Heidelberg, Tel. 06221/ 471881
- Chromatographiesäulen und Rundkolben: Fachhandel für Laborbedarf
- Exsikkator: Fachhandel für Laborbedarf
- Kanadabalsam: Fachhandel für Laborbedarf
- L_{15} , L_{25} : Fa. Carl Zeiß, 7082 Oberkochen, Postfach 1369, Art. Nr. 462929
- Methylacrylsäuremethylester: Merck Art. Nr. 800590
- Mikropaque: Fa. Nicholas GmbH, 6000 Frankfurt 1
- Phosphorpentoxid: Merck Art. Nr. 542
- Plastoid N: Röhm Pharma GmbH, Weiterstadt
- Polycut (Hartmetallmikrotom): Fa. Jung, Heidelbergerstr. 17-19,

6907 Nußloch

- Rußdispersionen: Degussa Ag, Postfach 2644, 6000 Frankfurt 1
- Sägemikrotom 1600: Ernst Leitz Wetzlar GmbH, 633 Wetzlar
- Spiegelglasmanometer: über Biodur Heidelberg
- Tupperware: Fachvertreter für Tupperware
- Ultrafräse: Fa. Jung, Heidelbergerstr. 17-19, 6907 Nußloch
- Vakuumpumpe: Fa. Arthur Pfeiffer, 633 Wetzlar, Tel. 06441/8021
- Wasserstrahlpumpe: Fachhandel für Laborbedarf

BEZUGSQUELLEN FÜR DIE VERSUCHSTIERE:

- Schäferhunde: MSHK Winterstetten
- Texelschafe: landwirtschaftlicher Zuchtbetrieb
- Wistar-Ratten: Fa. Karl Thomae GmbH, Biberach/Riß

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Florian Eitel, Oberarzt an der Chirurgischen Universitätsklinik München Innenstadt, für die Überlassung des Themas meiner Dissertationsarbeit und seine großzügige und hilfreiche Unterstützung bei der Arbeit.

Desweiteren möchte ich Herrn Dr. med. vet. Hans Peter Scheuber und den Mitarbeitern des Tier- und Histologielabors für ihre praktische Mithilfe danken.

9. Lebenslauf

Am 8.Mai 1959 wurde ich, Reiner Christian Seibold, als Sohn von Sonja Seibold, geb. Reich und Christian Seibold in München geboren. Von 1965 bis 1969 besuchte ich die Volksschule Neustift in Freising und anschließend von 1969 bis 1978 den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig am Josef-Hofmiller-Gymnasium ebenfalls in Freising. Dort legte ich 1978 die Reifeprüfung ab.

1978 begann ich daraufhin das Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich 1980 die Ärztliche Vorprüfung, 1982 das erste Staatsexamen, 1983 das zweite Staatsexamen und im Oktober 1984 das dritte Staatsexamen abschloß. Am 29.Oktober 1984 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

